

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Marili Palover

Telomeeride pikkuste seosed DNA metülatsiooniga

Magistritöö (30EAP)

Geenitehnoloogia

Juhendajad: Lili Milani, Ph. D.

Silva Kasela, M.Sc.

Tartu 2016

Telomeeride pikkuste seosed DNA metülatsiooniga

Viimastel aastatel on olnud palju uuringuid kromosoomide telomeerse DNA pikkuse seosega erinevates rakufunktsioonides alates raku vananemisprotsessi käivitamisest kuni kasvaja tekkimisele.

Käesolevas töös uuriti metülatsioonitaseme ja telomeeride pikkuste vahelisi seoseid. Valim koosnes 747 indiviidist, kus kõige noorem oli 18-aastane ja kõige vanem 84-aastane. Selleks mõõdeti telomeeride suhteline keskmine pikkus Q-PCR meetodil ning mudeldati telomeeride pikkuse mõju DNA metülatsioonile.

Meta-analüüsi tulemustes epigenoomselt olulisi CpG saite välja ei tulnud. Siiski parimad viis leitud näitasid võimalikku seost DNA metülatsiooni taseme ja telomeeride pikkuse vahel. Nende hulgas näiteks *MAP3K11* geen, mille puhul on varem näidatud, et see on oluline rakujagunemise regulatsioonil. Samuti tulid meta-analüüsi tulemustes välja potentsiaalselt huvitavad geenid *MPP4*, *CABP7* ja *MRPS6/SLC5A3*, mida tuleks kinnitada teises kohordis.

Märksõnad

Telomeerid, DNA metülatsioon, telomeeride mõõtmismeetodid, EWAS, vananemine

Associations between telomere length and DNA methylation levels

In recent years, there have been studies showing that the length of telomere repeats at chromosome ends is a critical variable in cell fate decisions and biological functions ranging from senescence to carcinogenesis.

In this study we tested for association between telomere length and cytosine methylation levels. Measurements of mean telomere length and DNA methylation of > 450 000 CpG sites were obtained from DNA blood samples. The study included 747 participants aged 18-84 years. We conducted epigenome-wide association studies and calculated estimates using meta-analyses.

None of the association between telomere length and DNA methylation reached epigenome-wide statistical significance. Based on this study, five top hits were located in the *MRPS6/SLC5A3*, *CABP7*, *MPP4* and *MAP3K11* genes and close to *RABGGTA* gene. Of note, *MAP3K11* has previously been reported to be associated with the regulation of cell division. Our results suggest the presence of a link between DNA methylation and telomere length although further studies should be conducted to validate the results and elucidate the underlying mechanisms of this relationship.

Keywords

Telomere length, DNA methylation, Telomere measurement methods, EWAS, ageing

CERCS: B220; Geneetika, tsütogeneetika

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Telomeeride struktuur ja funktsioon.....	8
1.2. Telomeraasi struktuur ja funktsioon	11
1.3. Telomeeride dünaamika vananemisel.....	12
1.4. Telomeeride pikkust mõjutavad faktorid	13
1.5. Telomeerid ja nende roll vanusega seotud haigustes.....	15
1.6. Meetodid telomeeride mõõtmiseks	16
1.6.1. Terminaalne restriksioonifragmendi analüüs	16
1.6.2. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon.....	17
1.6.3. Kindla kromosoomi telomeeride pikkuse analüüs	18
1.6.4. Kvantitatiivne fluorestsents <i>in situ</i> hübriidisatsioonimeetod.....	19
1.6.5. Voog - fluorestsents <i>in situ</i> hübriidisatsioonimeetod	19
1.6.6. Arvutuslikud meetodid telomeeride pikkuste mõõtmiseks	20
1.6.6.1. Kokkuvõtlik tabel telomeeride mõõtmismeetodite võrdluse kohta.....	21
1.7. DNA metülatsioon	22
1.8. Meetodid DNA metülatsiooni mõõtmiseks	24
1.8.1. Metülatsioonikiip <i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit</i>	24
1.8.2. DNA immuunosadestamine ja sekveneerimine.....	26
1.8.3. Ülegenoomne bisulfiti sekveneerimismeetod.....	26
1.8.4. Vähendatud esindatusega bisulfit sekveneerimismeetod	27
1.8.4.1. Kokkuvõttev tabel metülatsioonitaseme mõõtmismeetoditest.....	27
1.9. Telomeerid ja metülatsioon	28

1.10.	Üle-epigenoomne assotsiatsiooniuuring	29
2.	EKSPERIMENTAALOSA	30
2.1.	Töö eesmärk.....	30
2.2.	Materjalid ja metoodika	30
2.2.1.	Valimi kirjeldus	30
2.2.2.	Telomeeride mõõtmine ja saadud andmete eeltöötlus.....	32
2.2.3.	DNA metülatsiooni andmete eeltöötlus.....	34
2.2.4.	Üle-epigenoomne assotsiatsiooniuuring.....	34
2.2.5.	Meta-analüüs	35
3.	Tulemused	36
3.1.	Andmete eeltöötlus.....	36
3.2.	Andmeanalüüs.....	39
4.	Arutelu	44
	KOKKUVÕTE	48
	SUMMARY	49
	KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	52
	LISAD	63
	Lisa 1	63
	LIHTLITSENTS.....	64

KASUTATUD LÜHENDID

C_t	lävetsükkel, <i>Cycle of threshold</i>
5mC	5-metüültsütosiin
CABP7	kaltsiumiga seonduv valk 7, <i>Calcium Binding Protein 7</i>
CpG	tsütosiin-guaaniin dinukleotiid, <i>Cytosine and Guanine dinucleotide</i>
DDR	DNA kahjustusvastus, <i>DNA Damage Response</i>
DKC1	kaasasündinud düskeratoos 1, <i>Dyskeratosis Congenita 1</i>
DMR	erinevalt metüleeritud DNA regioon, <i>Differentially Methylated Region</i>
DNA	desoksüribonukleiinhape, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNMT	DNA metüültransferaas, <i>DNA Methyltransferase</i>
EWAS	üle-epigenoomne assotsiatsiooniuuring, <i>Epigenome-Wide Association Study</i>
Flow-FISH	voog-fluorestseeruv <i>in situ</i> hübridisatsioon, <i>Flow-Fluorecent in situ Hybridization</i>
GC	guaaniin-tsütosiin nukleotiidipaaride sisaldus võrreldes adeniin-tümiin nukleotiidipaaridega
GWAMA	ülegenoomne assotsiatsiooni meta-analüüs, <i>Genome-Wide Association Meta Analyses</i>
GWAS	ülegenoomne assotsiatsiooniuuring, <i>Genome-Wide Association Study</i>
IPF	idiopaatiline kopsufibroos, <i>Idiopathic Pulmonary Fibrosis</i>
KMI	kehamassiindeks
MAP3K11	mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas 11, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase 11</i>
MeDIP-seq	metüleeritud DNA immuunosadestamine-sekveneerimine, <i>Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing</i>
MPP4	MAGUK p55 alaperekonna liige 4, <i>MAGUK p55 subfamily member 4</i>
MRPS6	mitokondriaalne ribosoomi valk S6, <i>Mitochondrial Ribosomal Protein S6</i>
MYC	proto-onkogeenne valk, <i>MYC proto-oncogene protein</i>
NGS	järgmise põlvkonna sekveneerimine, <i>Next Generation Sequencing</i>
p53	kasvaja supressorvalk
POT1	telomeeri kaitsevalk 1, <i>Protection of Telomeres 1</i>
Q-FISH	kvantitatiivne-fluorestseeruv <i>in situ</i> hübridisatsioon, <i>Quantitative-Fluorecent in situ Hybridization</i>
Q-PCR	reaalaja polümeraas ahelreaktsioon, <i>Quantitative-Polymerase Chain Reaction</i>
RABGGTA	Rab geranüül-geranüültransferaas alfa subühik, <i>Rab Geranyl-Geranyltransferase Subunit Alpha</i>
RAP1	repressor/aktivaator valk 1, <i>Repressor/Activator Protein 1</i>

RRBS	vähendatud esindatusega bisulfiti sekveneerimine, <i>Reduced Representation Bisulfite Sequencing</i>
RTEL1	telomeeri elongatsiooni helikaas 1 regulaator, <i>Regulator of Telomere Elongation Helicase 1</i>
SAH	S-adenosüülhomotsüsteiin, <i>S-Adenosyl Homocysteine</i>
SAM	S-adenosüülmetioniin, <i>S-Adenosyl Methionine</i>
SD	standardhälve, <i>Standard Deviation</i>
SLC5A3	membraani transportvalk, <i>Solute Carrier family 5 member 3</i>
STELA	ühe kromosoomi telomeeride pikkuse analüüs, <i>Single Telomere Length Analysis</i>
SWAN	kvantilnormaliseerimisel põhinev kiibisisene normaliseerimine, <i>Subset-Quantile Within Assay Normalization</i>
TERC	telomeraasi RNA komponent, <i>Telomerase RNA Component</i>
TERT	telomeraasi pöördtranskriptaas, <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TIN2	TRF1 valguga seonduv tuumavalk 2, <i>TRF1-Interacting Nuclear Protein 2</i>
TPP1	TIN2 valguga seonduv valk 1, <i>TIN2-Interacting Protein 1</i>
TRF	terminaalne restriksioonifragmendi analüüs, <i>Terminal Restriction Fragment</i>
TRF1	telomeeriga seonduv valguline faktor 1, <i>Telomere Repeat Binding Factor 1</i>
TRF2	telomeeriga seonduv valguline faktor 2, <i>Telomere Repeat Binding Factor 2</i>
WGBS	ülegenoomne bisulfiti sekveneerimine, <i>Whole-Genome Bisulfite Sequencing</i>

SISSEJUHATUS

Telomeerid on kromosoomide otstes olevad kordusjärjestused, mis kaitsevad DNAd kaotsimineku eest rakujagunemisel. Telomeeridega seonduvad Shelterin valgukompleksi valgud, mis kaitsevad telomeere, et neid ei tuntaks ära kui DNA kahjustusi. Otsa-replikatsiooni probleemi tõttu lühenevad telomeerid iga mitootilise tsükliga, kuni need on liiga lühikesed, et rakujagunemine pole enam võimalik. See omakorda algatab raku vananemise protsessi või need rakud viiakse apoptoosi (Blackburn, 2001). Telomeeride lühenemist ei ole seostatud ainult vananemisega, vaid ka erinevate vanusega seotud haigustega nagu koronaararterite haigused, vähk, südamepuudulikkus ja telomeeride sündroomid (Calado ja Young, 2012).

DNA metülatsioon on üks epigeneetilistest mehhanismidest, mis kontrollib geeniekspressiooni. Selleks, et geen saaks ekspresseeruda, on geeni promootoralad tavaliselt metüleerimata. On näidatud, et vananedes normaalne DNA metülatsioonimuster muutub ja see põhjustab kohati metülatsiooni vähenemist (Gonzalo, 2010; Heyn jt., 2012). Mõned uuringud on aga vastupidiselt näidanud teatud CpG saitide ülemetüleeritust (Fraga ja Esteller, 2007). Muutused DNA metülatsioonis võivad muuta geeniekspressiooni, mis omakorda on oluline vanusest sõltuvate haiguste arenemisel (Horvath, 2013; Bocklandt jt., 2011; Hannum jt., 2013).

Viimastel aastatel on erinevate uuringute tulemused kokku võetud ja leitud, et kui nii telomeeride pikkus ja metülatsioonimuster vananedes muutuvad, siis võiks see viidata nende omavahelisele seotusele.

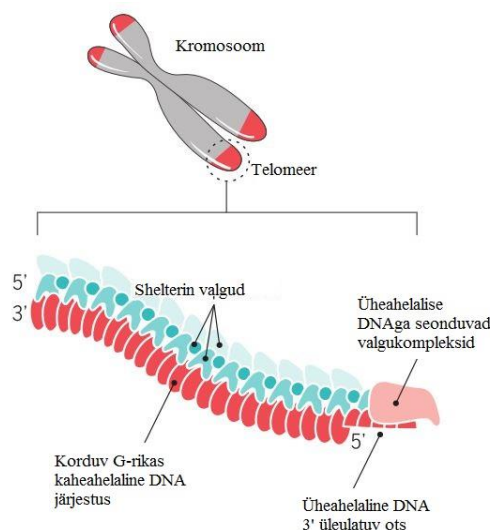
Käesoleva töö eesmärk oli leida telomeeride pikkuste ja DNA metülatsioonitaseme vahelisi seoseid, kasutades Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidoonorite täisvere DNA proove. Valimi suuruseks oli 747 indiviidi vanuses 18-84 aastat. Esiteks mõõdeti valitud indiviidide telomeeride suhteline pikkus Q-PCR meetodit kasutades. Indiviidide DNA metülatsioonitase on varasemalt mõõdetud > 450 000 CpG saidis Illumina450K kiibiga. Teiseks viidi läbi üle-epigenoomne assotsiatsiooni-analüüs ja nende põhjal meta-analüüs.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

Kromosoomide otsad on teadlasi köitnud juba alates 20. sajandi algusest. Telomeeride struktuuri avastasid esimesena Hermann Muller ja Barbara McClintock vastavalt äädikakärbse (Muller, 1938) ja maisi (McClintock, 1941) mudelitel. Sellegipoolest kirjeldati telomeeride funktsiooni kaitsta geneetilist infot kaotsimineku eest alles 1980ndatel kolme teadlase Elizabeth Blackburni, John Szostaki ja Carol Greider'i poolt (Blackburn ja Gall, 1978), mille eest nad said ka 2009. aastal Nobeli preemia.

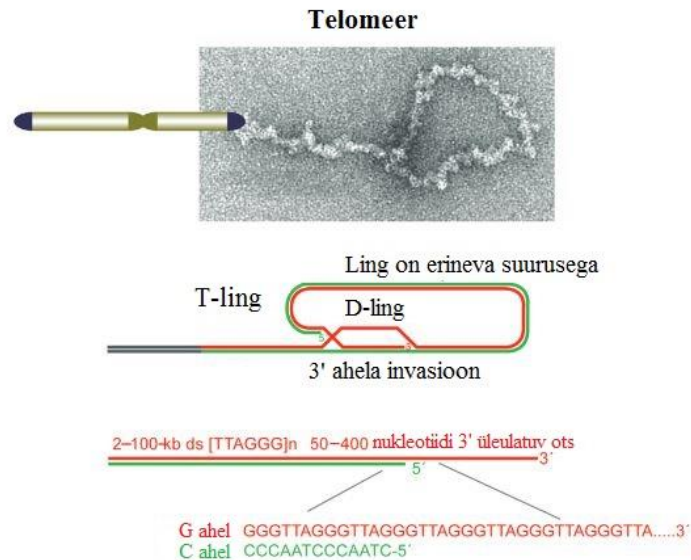
1.1. Telomeeride struktuur ja funktsioon

Telomeerid on heterokromatiinsed struktuurid, mis asuvad lineaarsete kromosoomide otstes ja koosnevad tandeemselt korduvatest DNA järjestustest, mis on seotud spetsiaalsete valgukompleksidega, mis telomeere kaitsevad (Joonis 1) (Sfeir ja de Lange, 2012). Inimestel on telomeerne DNA üles ehitatud kuni tuhandest tandeemselt korduvast TTAGGG heksanukleotiidist motiivist (Blasco, 2005), mille lõpus on üheaahelaline 3' üleulatuv G ahel, mis on 50-400 aluspaari pikk (Chai jt, 2006; Makarov jt, 1997). Tavaliselt lõpeb telomeeri lõpp T-linguga, mis moodustub kui G ahela 3' üleulatuv ots pöördub tagasi ja läheb kaheaahelalise telomeerse DNA regiooni sisse, tekitades veel ka väljatõrjuva-lingu (ing. k. *displacement loop*, D-ling) (Joonis 2) (Griffith jt., 1999; Doksani jt, 2013).



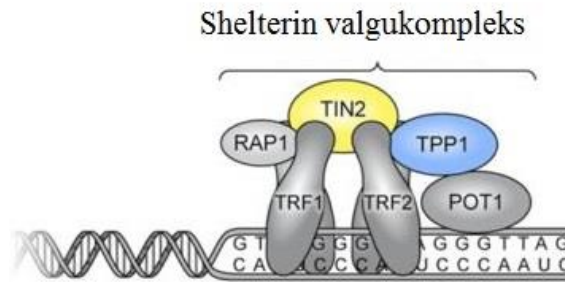
Joonis 1. Telomeeri struktuur. Inimese telomeerikompleks koosneb DNA kordusjärjestustest, mis on seotud kaitsvate Shelterin kompleksi valgudega. Lisaks kaitsevad valgukompleksid 3' üleulatuvat üheaahelalist telomeerse DNA 3' lõppregiooni. (kohandatud, Blackburn jt., 2015)

Õigesti formeerunud telomeeri struktuur takistab kromosoomi otsade äratundmist kui DNA ahela katkestusi DNA reparatsioonimehhanismide poolt. Samuti hoiab ära see homoloogilist rekombinatsiooni telomeeride vahel ning kromosoomi otsade ühinemist (ing. k. *end-to-end fusion*) (de Lange, 2002).



Joonis 2. T-lingu struktuur. Elektronmikroskoopiat kasutades on pildistatud telomeeri kromatiini fiibrid suletud T-ling konformatsioonis (Nikitina ja Woodcock, 2004). Joonise allosas on ära toodud T-lingu ehitus, D-lingu asetumine T-lingu sees ning üheaahelalise 3' telomeerse DNA üleulatuv ots, mis võib olla kuni 400 nukleotiidi pikkune. (kohandatud, Nikitina ja Woodcock, 2004)

Telomeerne DNA on seotud kuuevalgulise Shelterin kompleksiga, mis kaitseb kromosoomide otste fuseerumise ja degradatsiooni eest. Shelterin kompleksi kuuluvad: telomeeri kordustega seonduv valguline faktor 1 (TRF1 - *Telomere Repeat binding Factor 1*); telomeeri kordustega seonduv valguline faktor 2 (TRF2 - *Telomere Repeat binding Factor 2*); repressor/aktivaator valk 1 (Rap1 - *Repressor/Activator Protein 1*); TRF1-ga seonduv tuumavalk 2 (TIN2 - *TRF1-interacting nuclear factor 2*), TIN2-ga seonduv valk 2 (TPP1 - *TIN2-interacting Protein 1*) ja telomeeride kaitsevalk 1 (POT1 - *Protection Of Telomeres 1*) (de Lange, 2005; Palm ja de Lange, 2008). TRF1 ja TRF2 seonduvad kaheaahelalisele telomeeri kordusjärjestusele ning POT1 tunneb ära üheaahelalise telomeerse G-rikka 3' üleulatuva otsa (Joonis 3). TIN2, TPP1, Rap1 ja POT1 värvatakse telomeeridele TRF1 ja TRF2 poolt (de Lange, 2005; Palm ja de Lange, 2008).

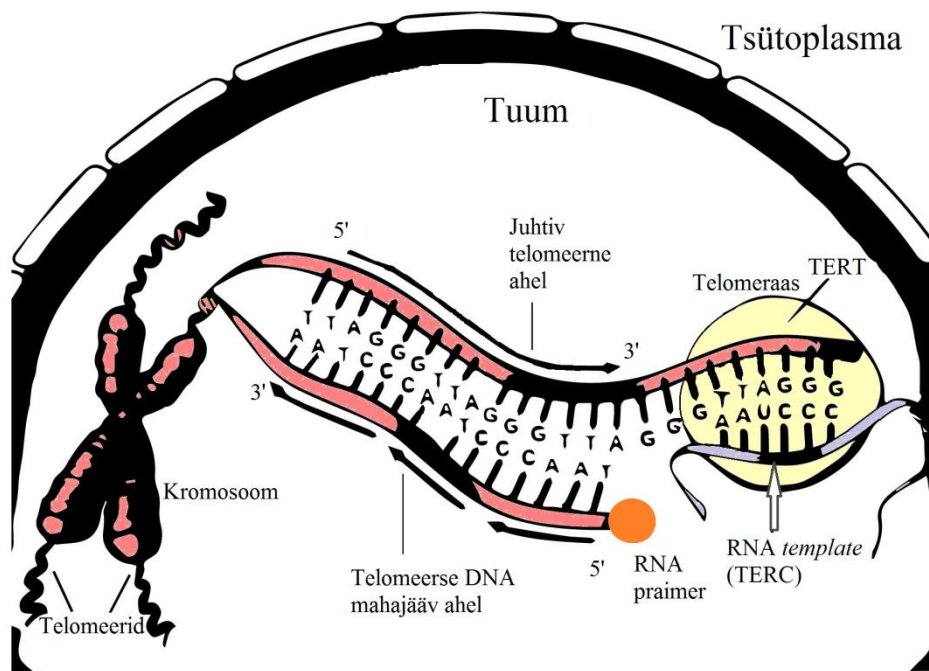


Joonis 3. Shelterin valgukompleks. Siia kuuluvad TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1, Rap1 valgud. (kohandatud, Townsley jt, 2015)

Somaatilistes rakkudes lühenevad telomeerid iga mitootilise rakujagunemise käigus 30-100 aluspaari, kuna DNA polümeraas ei suuda täielikult lineaarse kromosoomi 3' otsa replitseerida (Moyzis jt., 1988; Aubert ja Lansdorp, 2008). Esimesena kirjeldasid seda Olovnikov (1973) ja Watson (1972) ning nimetasid selle otsa-replitseerimisprobleemiks (ing. k. *end-replication problem*). Selle tõttu lühenevad kromosoomid progressiivselt mõlemast otsast peale igat rakujagunemist, mis põhjustab telomeeride lühenemist ajas kõikides rakutüüpides (Harley jt., 1990).

Telomeerid kaitsevad genoomset DNAd, et kromosomaalne DNA ei läheks rakujagunemisel kaotsi. Kui telomeerid muutuvad kriitiliselt lühikeseks, tuntakse nad ära DNA reparatsioonimehhanismide (DDR - *DNA Damage Response*) poolt kui DNA kahjustus ja see omakorda kutsub esile muutunud transkriptsiooniprofiili, rakutsükli peatamise ja raku vananemisprotsessi või rakusurma (Collado jt., 2007; Blackburn jt., 2006).

Telomeeride lühenemist eukarüootides kompenseeritakse ensüümi telomeraas abil, mis lisab kromosoomide otstes telomeerseid kordusjärjestusi ja taastab telomeeride pikkust (Blackburn jt., 2006).



Joonis 4. Telomeerid ja telomeraas. Telomeerid lühenevad iga DNA replikatsioonitsükli jooksul ~50–100 nukleotiidi ulatuses otsa-replikatsiooni probleemi tõttu, kus DNA polümeraas sünteesib DNA-d 5'→3' suunas juhtivalt ahelalt järjepidevalt. Mahajäävalt ahelalt on süntees katkendlik, kus sünteesitavate fragmentide jaoks on vajalik RNA praimer, et 5' initsiatsioon toimuks. Kuna RNA praimer peab enne sünteesi mahajäävale ahelale seonduma ning olema komplementaarne juhtiva ahela nukleotiididega, siis 5' mahajääv ahel on alati lühem kui 3' juhtiv ahel ning seega toimub replikatsioon mittetäielikult. Lühenenud telomeerid on võimalik taastada ensüüm telomeraas abil, mis koosneb telomeraasi pöördtranskriptaasist (TERT) ja telomeraasi RNA komponendist (TERC), mis on uue komplementaarse juhtiva telomeerse DNA sünteesiks vajalik (Mitchell jt., 1999). (kohandatud, Lindqvist jt., 2015)

1.2. Telomeraasi struktuur ja funktsioon

Telomeraas on ensüüm, mis tasakaalustab rakujagunemisel tekkivat telomeeride lühenemise efekti, lükates sellega raku vananemisprotsessi ja rakusurma edasi (Greider ja Blackburn, 1985). Telomeraas koosneb polümeraas-pöördtranskriptaasist (TERT - *Telomerase Reverse Transcriptase*), mis pikendab telomeeride 3' üheahelalist otsa, lisades telomeerseid DNA kordusmotive, ja RNA järjestuse komponendist (TERC - *Telomerase RNA Component*), mille abil saab uusi *de novo* telomeerse DNA kordusjärjestusi lisada (Joonis 4). Samuti kuulub telomeraasi juurde düskeriini valgukompleks, mis seondub telomeraasi RNA komponendile ja stabiliseerib telomeraasi kompleksi (Mitchell jt., 1999). Mutatsioonid telomeraasi funktsioneerimiseks olulistes geenides nagu *TERT*, *TERC* ja *DKC1* (*Dyskeratosis Congenita 1*), üks düskeriini kompleksi kodeerivatest valkudest, põhjustavad telomeeride

sündroome ehk telomeropaatiid. Holoensüümi kokkupanek toimub Cajali kehakestes, kus TERT ja TERC moodustavad ribonukleovalgu ensüümkompleksi (Podlevsky ja Chen, 2012).

Telomeraas on ekspresseeritud piiratud arvul rakutüüpides - iduteeliini ja tüvirakkudes, kus telomeraasi ekspressioon on rangelt reguleeritud. Telomeraasi ekspressiooni aktiveerivad näiteks *MYC*, proto-onkogeen, mis reguleerib transkriptsioonifaktorite seondumist, ja suguhormoonid. Telomeraasi geenide promootorpiirkond sisaldab regulatoorseid järjestusi, mis on moduleeritud östrogeeni poolt. Rakud, mis on vastuvõtlikud androgeenidele ja östrogeenile, ekspresseerivad telomeraasi kõrgemal tasemel. (Calado jt., 2009) Näiteks on juba 1960ndatest aastatest androgeene kasutatatud luuüdi puudulikkuse raviks, kus telomeraas reageerib positiivselt androgeenidega ravimisel. Seda on näidatud eesnäärme vähirakkudes, reproduktiivkudedes (Bayne ja Liu, 2005) ja hematopoeetilistes rakkudes (Calado jt., 2009). Östrogeen kiirendab *TERT* ekspressiooni ja telomeraasi aktiivsust (Kyo jt., 1999; Misiti jt., 2000). Somaatilised rakud telomeraasi ei ekspresseeri (Galati jt., 2013).

On leitud, et kui telomeraasi ekspressioon hiirtes alla reguleerida, on järgnevatel põlvkondadel järjest lühemad telomeerid, kujunevad degeneratiivsed organite häired ning lõpuks kaotavad hiired paljunemisvõime (Rudolph jt., 1999). Kui hiirtes telomeraas üle ekspresseerida, elavad need hiired kauem ning põevad vähem vanusega seotud haigusi (Blasco, 2007).

Kuna lühikesed telomeerid limiteerivad rakujagunemist, on telomeere pikendavad mehhanismid pideva uurimise all regeneratiivses meditsiinis.

1.3. Telomeeride dünaamika vananemisel

Vananemine on mitmete põhjustega protsess, mille tagajärjel toimub progressiivne funktsiooni kadu raku-, koe- ja organismi tasemel. Viimastel aastatel on leitud mitmeid raku vananemisprotsessi põhjustavaid molekulaarseid radu, mis kõik on olulised organismi vananemise juures nagu telomeeride lühenemine (Stanley ja Armanios, 2015; López-Otín jt., 2013), rakuvananemine (Harley jt., 1990), genoomi ebastabiilsus (O'Sullivan ja Karlseder, 2010) ja epigeneetilised muutused (Pollina ja Brunet, 2011). Sealjuures peetakse aga telomeeride lühenemist üheks peamiseks rakulise vananemisprotsessi alguse kiirenemise põhjuseks, kuna see võib eelnevalt loetletud protsesse põhjustada (Selman jt., 2016).

Telomeerid lühenevad, kui inimene vananeb (Blackburn, 2001), mis on andnud alust spekulatsiooniks kasutada telomeeride pikkust bioloogilise markerina vananemisel (Sanders

ja Newman, 2013; Armanios, 2013). Telomeeride lühenemises peitub justkui geneetiline vanus (molekulaarne kell), mida Hayflick tegelikult juba ka 1961. aastal kirjeldas, et seletada rakkude limiteeritud eluiga kultuuris, tuntud ka kui „Hayflicki limiit“ (ing. k. *Hayflick limit*) (Hayflick ja Moorhead, 1961). Telomeeride pikkus peegeldab rakkude replitseerumisajalugu ja vastuvõtlikust oksüdatiivsele stressile, mis arvatakse iseloomustavat vananemisprotsessi paremini kui kronoloogiline vanus (Aviv, 2006; von Zglinicki ja Martin-Ruiz, 2005; Harley jt., 1990). Siinjuures peab meeles pidama, et rakuline vananemine ei ole võrdväärne organi ega organismi vananemisega.

Granulotsüütide ja naiivsete T-rakkude puhul toimuvad oluliselt suured erinevused esimese viie aasta jooksul pärast sündi, pärast mida telomeeride pikkus on stabiilne nii lapse- kui noorukiea jooksul (Rufer jt., 1999). Peale noorukiiga hakkab telomeeride pikkus jälle oluliselt vähenema (Okuda jt., 2002; Farzaneh-Far jt., 2010). On näidatud, et kui inimene sünnib, on leukotsüütide telomeeride pikkus ~10 000 aluspaari ning surres ~5000 aluspaari (Okuda jt., 2002).

Põhinedes varem kirjanduses näidatud seostele, on seni veel vastamata küsimus, kas vananemine põhjustab telomeeride lühenemist või telomeeride lühenemine organismi vananemist (Hornsby, 2006). Antud küsimusele saab sõltuvalt rakutüübist ja haigusest erinevalt vastata, olenevalt, mis külje alt küsimusele läheneda.

1.4. Telomeeride pikkust mõjutavad faktorid

Lühem telomeeride pikkus on seotud erinevate mõjuteguritega, mida on varem kirjeldatud: vanus, rakujagunemise ajalugu ja koe tüüp (Aubert ja Lansdorp, 2008). Samuti võivad telomeeride lühenemist võimendada keskkonnategurid nagu krooniline stress, indiviidi eluviis sh suitsetamine, alkoholi tarbimine ja ülekaalulisus.

Kõige suuremat mõju telomeeride pikkusele on kirjeldatud oksüdatiivsete kahjustuste puhul. Von Zglinicki, (2002) on näidanud, et telomeerses DNAs parandatakse oksüdatiivse stressi põhjustatud kahjustusi vähem kui mujal kromosoomis. Seega keskkonna põhjustatud oksüdatiivne stress kiirendab telomeeride kulumist ühest rakutsüklist teise ning rakusisesest antioksidantsest kaitsest ei piisa (von Zglinicki, 2002). Telomeeride kiirenenud lühenemist on näidatud ka psühholoogilise stressi puhul (Lindqvist jt., 2015; Shalev jt., 2012; Wolkowitz jt., 2011). Samuti on kirjeldatud ka, et indiviididel, kes kannatavad depressiooni all, vastab

telomeeride pikkus kuni 10 aastat vanemale bioloogilisele vanusele, võrreldes tervete indiviididega (Simon jt., 2006).

Suitsetamine, ebatervislik toitumine, sh alkoholi tarvitamine ja kõrge kolesterool või ülekaalulisus võimendavad telomeeride lühenemist, kuna põhjustavad oksüdatiivset stressi ja põletikku kudedes (Verde jt., 2015; Strandberg jt., 2012; Müezziner jt., 2015). On isegi näidatud, et mõõdukas alkoholi tarvitamine, mida kardiovaskulaarsete haiguste ennetamiseks pigem soovitatakse, on pikas perspektiivis siiski seotud telomeeride kiirema lühenemisega (Strandberg jt., 2012). Suitsetamise puhul on näidatud, et see põhjustab oksüdatiivseid kahjustusi (Esterbauer jt., 1991; Verde jt., 2015), mis ühtlasi tõstab oksüdatiivse stressi taset kehas, mõjutades nii telomeeride kulumiskiirust (Huzen jt., 2014; Valdes jt., 2005) ja mis omakorda kiirendab rakkude vananemisprotsessi. Samuti loetakse suitsetamist üheks tugevaimaks riskifaktoriks südame koronaarhaiguste kujunemisel (Ambrose ja Barua, 2004).

Kõigele eelnevale vastukaaluks on olemas ka faktoreid, mis aeglustavad telomeeride lühenemist. Eluharjumused nagu füüsiline aktiivsus, treenimine ja heas vormis olek (Werner jt., 2009; Song jt., 2010; Soares-Miranda jt., 2015) on seotud telomeeride pikkuse säilimisega ning aeglasema kulumisega. Denham jt., (2013) näitasid, et pikamaajooksjate telomeerid on istuvama elustiiliga inimestega võrreldes 324-648 aluspaari pikemad, mis korreleerub ~16,2 aastat noorema bioloogilise vanusega (Denham jt., 2013). Werner jt., (2009) näitasid, et noortel ja keskmises vanuses atleetidel on telomeraasi aktiivsus võrreldes vähem sportlike inimestega suurenenud.

Huvitava faktina on kirjeldatud, et naiste valgete vererakkude telomeerid on pikemad kui meestel (Hunt jt., 2008). Kuna seda vahet ei ole tõestatud kohe peale sündi, arvatakse, et antud lahknevus on seotud meeste ja naiste erinevas östrogeeni tasemes, kus östrogeen stimuleerib telomeraasi ja vähendab oksüdatiivset stressi (Kyo jt., 1999).

Vastukaaluks kõigile eelnimetatud keskkonnafaktoritele on leukotsüütide telomeeride pikkus mõjutatud ka geneetiliste faktorite poolt. Hiljutised ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud on näidanud seost leukotsüütide telomeeride pikkuse ja mitmete levinud geneetiliste variantide vahel (Codd jt., 2013). Samuti on kaksikute- ja pereuuringud hiljutise ~20 000 indiviidiga metaanalüüsi tulemustes näidanud, et leukotsüütide telomeeride pikkus on päritav (Broer jt., 2013). Kaksikute uuringute puhul on täheldatud ka, et kaksik, kellel on pikemad telomeerid, näeb noorem välja ja elab kauem (Christensen jt., 2009). Mitmeid kaksikute uuringuid on veel läbi viidud (Andrew jt., 2006; Vasa-Nicotera jt., 2005), mille alusel võiks hinnanguline telomeeride pikkuse päritavus jääda 34-82% juurde.

1.5. Telomeerid ja nende roll vanusega seotud haigustes

Kriitiliselt lühikesed telomeerid indutseerivad rakulist vananemisprotsessi, mis on aluseks erinevate vanusega seotud haiguste enneaegsele esinemisele (Muñoz-Espín ja Serrano, 2014) nagu kardiovaskulaarsed haigused ja vähk (D'Mello jt., 2014; Weischer jt., 2012; Wentzensen jt., 2011). Samuti on andmeid, et telomeeride kulumine ja mittefunktsioneerimine on põhjuslikud faktorid haigustele nagu ateroskleroos (Benetos jt., 2004), müokardi infarkt (Brouillette jt., 2003), Alzheimeri tõbi (Panossian jt., 2003) ja südamepuudulikkus (Oeseburg jt., 2010). Muidugi võib igast vananevast endoteeli-rakust leida seose lühenenud telomeeridega, kuid tänaseni ei ole veel teada, kas lühikesed telomeerid põhjustavad haigust, peegeldavad haiguse protsessi või on kombinatsioon mõlemast (Masi jt., 2014).

Esimene kliiniline uuring, mis seostas telomeeride pikkuse koronaararterite haigustega, oli 2001. aastal, kus näidati, et koronaararterite haiguste diagnoosiga patsientidel on leukotsüütide telomeerid ~300 aluspaari lühemad kui indiviididel, kel seda diagnoosi ei ole. See omakorda vastab umbes 9-aastasele bioloogilisele vanusevahele võrreldes tervete inimestega (Samani jt., 2001). Põhiline haigus, mis koronaararterite haigust põhjustab, on ateroskleroos, mille puhul on näidatud, et see põhjustab kiiremat raku degeneratiivset fenotüüpi (Benetos jt., 2004). Inimesed, kellel on keskmiselt lühemad telomeerid, on kõrgema riskiga haigestumaks ateroskleroosi ning altimad kõrgvererõhu haiguse tekkimisele (Brouillette jt., 2007; Yang jt., 2009). Ateroskleroosi tüsistuse südamepuudulikkuse uuringute käigus on leitud, et südamepuudulikkuse diagnoosiga patsientidel on 25% lühemad telomeerid võrreldes tervete inimestega (Oh jt., 2003).

Kui telomeerid muutuvad liiga lühikeseks ja kaotavad võime seonduda kaitsvate Shelterin valkudega, on rakul kaks võimalust: 1) rakkudes, kus rakutsükli kontrollpunktid on terved, indutseeritakse vananemisprotsessi telomeeride lühenemisel või 2) kui rakutsükli kontrollpunktid on defektsed ja puudub p53, mis on kasvajate supressorvalk, siis põhjustab telomeeride mittefunktsioneerimine genoomset ebastabiilsust, mis soosib kasvajaliste protsesside arengut (Sfeir, 2012). p53 on kasvajate supressorvalk ning stressivastusena selle hulk rakus suureneb. Wentzensen jt., (2011) on viinud läbi meta-analüüsi, kus nad uurisid telomeeride pikkust põie-, soole- ja neeruvähi korral, kus kõigi eelnimetatud vähivormide puhul oli keskmine telomeeride pikkus lühem kui tervetel indiviididel. Telomeeride järkjärguline lühenemine on evolutsiooniliselt arvatud olevat loomulik vähkkasvajate allasurumismehhanism, kuid vastuoluliselt suurendab see samal ajal vähkkasvajate arengut, kuna tekib rohkem rakke, kus telomeerid ei funktsioneer korralikult (Suram ja Herbig, 2014).

Ka on kirjeldatud telomeeride sündroome, mis tähendab pärilikku seisundit, kus indiviidil esinevad mutatsioonid telomeere säilitavates geenides, näiteks *TERT* ja *TERC*, mis põhjustavad erinevate kudede enneaegset regeneratiivse võime kadu ning kriitiliselt lühikesi telomeere. Inimestel on telomeraasi puudust seostatud enneaegsete vanusega seotud haiguste arenguga nagu luuüdi puudulikkus, kopsuhaigused ja kaasasündinud düskeratoos. (Armanios ja Blackburn, 2012)

1.6. Meetodid telomeeride mõõtmiseks

Kuna telomeeride lühenemine on seotud paljude terviseprobleemidega, on välja töötatud mitmeid meetodeid, millega on võimalik telomeersete kordusjärjestuste pikkusi mõõta. Kõigil neil on omad plussid ja miinused. Üks vanemaid on terminaalne restriksioonifragmendi analüüs (TRF - *Terminal Restriction Fragmentation*) ja üks populaarsemaid reaalsea polümeraasi ahelreaktsioonil (Q-PCR - *Quantitative-Polymerase Chain Reaction*) põhinev meetod. Alternatiivseteks meetoditeks, mis võimaldavad kromosoomispetsiifiliselt telomeere mõõta, on STELA (*Single Telomere Elongation Length Analysis*) ning Q-FISH (*Quantitative-Fluorescence in situ Hybridization*). Samuti on viimastel aastatel hakatud kasutama järgmise põlvkonna sekveneerimisandmetel põhinevaid arvutuslikke meetodeid telomeeride mõõtmiseks.

1.6.1. Terminaalne restriksioonifragmendi analüüs

Terminaalne restriksioonifragmendi (TRF - *Terminal restriction fragment*) analüüs on üks esimesi meetodeid, millega hakati keskmist telomeeride pikkust määrama (Allshire jt, 1989). Genoomne DNA töödeldakse fragmentideks restriksiooniensüümide seguga kasutades. Nendel ensüümidel puuduvad äratundmisjärjestussaidid telomeersetes ja subtelomeersetes regioonides ning seega nad telomeeri DNAd ei lõika. Tulemuseks saadakse lühemad genoomifragmendid ja pikemad lõikamata telomeerid. Gelelektroforeesil selekteeritakse välja terviklikud telomeerse DNA järjestused ning need omakorda visualiseeritakse Southern blot meetodil. DNA jääb siis vastavalt bändina (ing. k. *smear*), mille suurust ja intensiivsust võrreldakse DNA markeriga ning saadakse teada fragmendi keskmine pikkus (Allshire jt., 1989; Harley jt., 1990; Kimura jt., 2010).

Selle meetodi tugevused on tulemuste võrreldavus teiste teadlaste TRF andmetega. Küll aga võivad erinevate laborite vahel tulemused erineda, kui kasutatakse erinevaid

restriktsiooniensüüme. Samuti võib telomeeride pikkust ülehinnata, kui kasutatakse restriktsiooniensüüme, mis arvestavad tulemustesse ka subtelomeerse DNA. Teine suurem puudujääk on suure koguse DNA (~1µg) vajaminek, mis paneb piirangud uuritavate kudede sobivusele. See meetodika ei võimalda väga lühikeste telomeeride määramist, mis vähesel arvul kromosoomidel on (Aubert jt., 2012) ega ka iga kromosoomi telomeeri pikkuse eraldi mõõtmist.

1.6.2. Reaalaja polümeraasi ahelreaktsioon

Kuna TRF meetodi jaoks oli vaja väga suuri DNA koguseid, töötati välja polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) põhinev meetod. Siia alla käivad reaalaja PCR (Q-PCR) ja monokroomne multipleksne reaalaja PCR. Enne kui Cawthon (2002) Q-PCR meetodika protokoll kirjeldas, ei olnud PCR meetodit varem telomeeride mõõtmiseks kasutatud. Seda selle tõttu, et kuuenukleotiidilist tandemjärjestust oli võimatu amplifitseerida komplementaarsete praimeritega, kuna tekkisid praimerite dimeerid, mis raskendas sihtmärk-DNA amplifitseerimist (Cawthon, 2002). Cawthon kirjeldab spetsiaalselt disainitud primereid, milles on sisse viidud mitu ühenukleotiidilist valepaardumist (ing. k. *mismatch*) (Joonis 5) ning mis selle tõttu saavad seonduda C- ja G-rikastele segmentidele nii, et praimerite dimeere tekib oluliselt vähem. Pärast kahte madalal temperatuuril PCR tsüklit muudetakse PCR programmis seondumistemperatuur kõrgemaks, mis hoiab ära edasise praimerite seondumise sihtmärkjärjestusele, ning amplifitseeritakse kindla pikkusega molekule, mis esimeste tsüklite ajal amplifitseeriti.

Amplifikatsiooni mõõdetakse kvantitatiivselt ja võrreldakse, kui palju erineb proov standard-DNA proovist suhtena telomeerse kordusjärjestuse koopianumbriga (T) ühe koopia geeni (S) koopianumbrisse. Ühe koopia geeni amplifikatsioon on oluline telomeeride pikkuse mõõtmise täpsusel.

Q-PCR meetodi tarkvara määrab igale proovile tsükli läve, C_t (ing. k. *cycle of threshold*). See on PCR tsüklite arv, kus *SYBR* green fluorestsentsi signaal ületab taustsignaalist oluliselt kõrgemale määratud signaali piirväärtuse. C_t väärtus peaks olema lineaarses seoses vaadeldava geeni kontsentratsiooni logaritmiga proovis. Uuritavate proovide arvutuslikke kontsentratsiooniväärtusi võrreldakse standardproovi DNAGA, milleks võib olla ükskõik milline DNA proov, eelistatavalt pikkade telomeeridega proov. Lõpuks saadakse T/S suhe, mis on proportsionaalne keskmise telomeeri pikkusega uuritavas proovis (Cawthon, 2002).

1.6.4. Kvantitatiivne fluorestsents *in situ* hübriidisatsioonimeetod

Q-FISH (*Quantitative Fluorescence in situ Hybridization*) meetodit kasutatakse metafaasi kromosoomide või interfaasi tuumade telomeersete järjestuste pikkuste hindamiseks hübriidisatsioonil fluorestseeruva (CCCTAA)₃ prooviga. Erinevalt TRF ja PCR-l põhinevatest analüüsides on Q-FISH substraadiks rakud. Need rakud võivad olla värsked (vajalikud kromosoomispetsiifilisteks analüüsideks), külmutatud, formaliiniga fikseeritud või permeabiliseeritud. Q-FISH meetodi töötas välja Lansdorp jt., (1996). Telomeerid visualiseeritakse hübriidisatsioonil, kasutades telomeerse kordusjärjestuse proovi (CCCTAA)₃, ülejäänud kromatiin visualiseeritakse mittespetsiifilise DNAGA seonduva värviga näiteks DAPI.

Meetod on hea, kuna ei hinda ainult lühikeste telomeeride pikkusi ega keskmist telomeeri pikkust, vaid võimaldab ka kromosoomispetsiifiliselt telomeere mõõta. Samuti on see ainuke meetod, millega saab visualiseerida telomeerivabasid kromosoomi otsi. Metafaasi Q-FISH miinuseks on aga see, et telomeere ei saa mõõta rakkudes, mis ei ole mitootiliselt aktiivsed. Ka on meetod töömahukas, kulukas ning tehniliselt nõudlik.

Täienduseks metafaasi Q-FISH meetodile arendati interfaasi Q-FISH, kus uuritakse interfaasi rakke. Interfaasi Q-FISH hindab telomeeri pikkust tuumas erinevates proovitüüpides (vererakud, külmutatud kude, formaliiniga fikseeritud rakud jm). Antud meetod võrdleb telomeerse proovi ja tsentromeerse prooviga saadud fluorestsentssignaali ning seejärel arvutatakse signaali intensiivsuste suhe sihtmärkjärjestuste vahel (Aubert jt., 2012; Vera ja Blasco, 2012).

Meetod on hea, kuna saab lokaliseerida täpselt need rakud, mis pakuvad huvi, ning samuti ei ole see analüüs nii töömahukas kui metafaasi Q-FISH. Puudustena tuleb arvestada sellega, et see meetod ei näita telomeerivabu kromosoomide otsi ning telomeeride pikkuste andmed esitatakse keskmise väärtusena.

1.6.5. Voog - fluorestsents *in situ* hübriidisatsioonimeetod

Flow-FISH (ing. k. *Flow-Fluorescent in-situ hybridization*) on samuti Q-FISH meetodi täiendusena arendatud, kus on kombineeritud läbivoolutsütomeetria ning hübriidisatsioon (Rufer jt., 1998). Flow-FISH kasutab samuti telomeerset (CCCTAA)₃ proovi, mida kasutatakse ka Q-FISH meetodis kvantiseerimaks keskmist fluorestsentsi hulka rakkudes. Süsteemis olevad rakud voolutatakse ükshaaval laserkiirtest mööda ning nende

fluorestseeruva signaali alusel, saab eraldada rakupopulatsioonid. Saadud väärtust kasutatakse uuritava rakupopulatsiooni telomeeride pikkuse hindamiseks (Hultdin jt., 1998).

Meetodi plussiks on võimalus rakud alampopulatsioonideks sortida. Seda meetodit on palju kasutatud hematopoeetiliste rakkude alatüüpide keskmise telomeeri pikkuse detekteerimiseks. See on esimene telomeeride mõõtmise meetod, mis leidis kasutust kliinilistes uuringutes näiteks kaasasündinud düskeratoosi puhul (Alter jt., 2007). Läbivoolutsütomeetria on võimalik kombineerida ja eelpool kirjeldatud meetoditega, eraldades puhastatud rakkudest DNA, mida saab analüüsida näiteks Q-PCR meetodiga.

Meetodi limiteerivateks faktoriteks on see, et mittefikseeritud rakke on raske töödelda ning DNA proov, mida kasutatakse, seondub mittespetsiifiliselt tsütoplasma struktuuridele. See meetod annab sarnaselt TRF ja Q-PCR meetodile ainult keskmise telomeeride intensiivsuse väärtuse ja ei anna infot kromosoomispetsiifiliselt telomeeride kohta.

1.6.6. Arvutuslikud meetodid telomeeride pikkuste mõõtmiseks

Eelnevalt mainitud meetodid telomeeride pikkuste hindamiseks on kõik võrdlemisi töömahukad, kallid ning neil on mitmeid puuduseid. Seetõttu on hakatud laialdaselt saadaolevaid ülegenoomse järgmise põlvkonna sekveneerimistulemuste (NGS - *Next Generation Sequencing*) andmeid kasutama telomeeride pikkuse hindamiseks arvutuslike meetoditega. Need põhinevad lühikeste telomeersete kordust sisaldavate lugemite loendamisel (Ding jt, 2014).

Nersisyan ja Arakelyan, (2015) töötasid välja Computel tarkvara, mis töötab lühikeste lugemite joondamise põhimõttel spetsiaalsele indeksile, mis on disainitud nii, et telomeersed lugemid paigutuvad sellele unikaalses positsioonis. Computel võtab ülegenoomse NGS lühikesed lugemid sisendiks ja paigutab need telomeersele indeksile, mis on koostatud telomeerse korduse mustri ja lugemi pikkuse põhjal. Telomeeri keskmine pikkus arvutatakse põhinedes telomeerse ja referentsgenoomi kattuvuse suhtel, kromosoomide arvul ja lugemi pikkusel. Analüüs on kinnitanud, et keskmine telomeeri pikkus on arvutatud kõrge täpsusega ja see ei sõltu lugemi pikkusest, lühikese lugemi tüübist, kattuvusest ega sisendi suuruselt. (Nersisyan ja Arakelyan, 2015)

Computel võimaldab ka pooltelomeersete proovide pikkusi hinnata, kuna disainitud indeksile on 3' lõppu lisatud N_n -nukleotiide. See toimib lahendusena ka referentsgenoomi

mittetäielikule infole, mis osaliselt või täielikult on telomeersete järjestuste osas puudulik. (Nersisyan ja Arakelyan, 2015)

Ding jt., (2014) töötasid välja TelSeq tarkvara, mis arvutab telomeeri pikkuse valemi $l = t_k sc$, abil, kus l on keskmine telomeeri pikkus, t_k on telomeersete lugemite hulk, s on kõikide lugemite fraktsioon, mille GC sisaldus on 48-52% vahel, ja c on konstant, kus genoomi pikkus jagatakse telomeeri lõppude arvuga. See on alternatiivne arvutuslik meetod NGS andmete põhjal telomeeri pikkuste hindamiseks. (Ding jt., 2014)

TelSeq puuduseks on, et see paneb lävendi telomeersete korduste arvule, mis muudab väljundi tulemused sõltuvaks nii lävendist kui lühikese lugemi pikkusest, mis väljendub ebatäpses tulemuses, kui lugemi pikkus kaldub 100nt kõrvale (näiteks 36 või 150 nukleotiidi). Computel töötab lühikeste lugemite pikkuse analüüsil hästi (20-150 nukleotiidi).

Järgmise põlvkonna sekveneerimise üldiseks puuduseks on aga sekveneerimisvead, kus igaüks üksik viga nukleotiidijärjestuses moonutab telomeerset mustrit ja mõjutab telomeersete lugemite arvu, kuna joondamine on vähetundlik sellist tüüpi vigade suhtes.

Praeguseks ei ole veel järgmise põlvkonna sekveneerimisandmete põhjal võimalik üksikute kromosoomide telomeeride pikkusi arvutada, kuna telomeerid on kromosoomiti erineva pikkusega. Ka on põhimõtteliselt võimatu lühikeste telomeersete lugemite päritolu identifitseerida.

1.6.6.1. Kokkuvõtlik tabel telomeeride mõõtmismeetodite võrdluse kohta

Tabelis 1 on eelpool käsitletud meetodeid omavahel võrreldud, on ära toodud, millisest proovist telomeeride pikkust mõõta saab, kas meetod on kromosoomispetsiifiline või mõõdab keskmist telomeeride pikkust, kui täpne meetod on ja kas see on sobilik suure valimi korral või ei.

Tabel 1. Telomeeride mõõtmismeetodite kokkuvõttev võrdlus

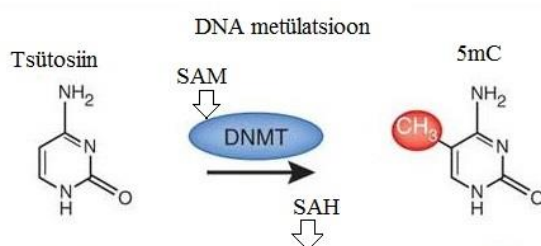
Meetod	Sisend	Mõõdab keskmist	Mõõdab kromosoomi-spetsiifiliselt	Resolutsioon (aluspaarides)	Sobilik suurele valimile
TRF	DNA	Jah	Ei	1,0 (Aubert jt.,	Ei
Q-PCR	DNA	Jah	Ei	- (Aubert jt., 2012)	Jah
Q-FISH	Metafaasi kroom-soomid: $0,5-2 \times 10^6$ leukotsüüdid	Jah	Jah	0,15-0,3 (Aubert jt., 2012)	Ei
	Interfaasi tuumad: $0,5-2 \times 10^6$ leukotsüüdid	Jah	Ei	0,15-0,3 (Aubert jt., 2012)	Ei
STELA	DNA	Ei	Jah	0,1 (Aubert jt.,	Ei
Flow-FISH	Interfaasi tuumad	Jah	Ei	0,2-0,3 (Aubert jt., 2012)	Ei
Computel	NGS andmed-lühikesed telomeersed lugemid	Jah	Ei	2-3,0 (Nersisyan ja Arakelyan, 2015)	Jah/Ei
TelSeq	NGS andmed-lühikesed telomeersed lugemid	Jah	Ei	2,5-4,0 (Ding jt., 2014)	Jah/Ei

1.7. DNA metülatsioon

Epigenoom on kui kaart tunnustest nagu DNA-valk interaktsioonid, histoonide modifikatsioonid, DNA metülatsioon (Bernstein jt., 2010). Selle kaardiga tegeleb eraldi teadusharu epigeneetika, mis uurib mitootiliselt ja meiotiliselt päranduvaid variatsioone geeniekspressioonis, mis ei ole põhjustatud muutustest DNA järjestuses.

Enimuuritud epigeneetiline modifikatsioon on DNA metülatsioon (Hotchkiss, 1948). Selgroogsetes kõige levinum DNA metülatsiooni vorm on 5-metüültsütosiin (5mC), mis esineb 70-80%-l CpG dinukleotiidsetest järjestustest (CpG sait). Metülatsiooni viivad läbi

metüültransferaasid, kus metüülrühm lisatakse CpG dinukleotiidi tsütosiini 5' positsioonis olevale süsinikule (Joonis 6) (Razin ja Cedar, 1977). DNA metüültransferaasid kasutavad S-adenosüülmetioniini (SAM - *S-Adenosyl Methionine*) metüülrühma doonorina metüülgrupi ülekandeks tsütosiini viiendale süsinikule. S-adenosüülhomotsüsteiin (SAH - *S-Adenosyl Homocysteine*) on metüülgrupi ülekande kofaktor (Maresca jt., 2015). Metülatsioon võib 0,02-2% (Lister jt., 2009) juhtudel esineda ka mitte-CG dinukleotiididel CHH ja CHG kontekstis, kus H = A, C või T. Seda on näidatud näiteks inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes (Lister jt., 2009) ja hiire ajukoes (Xie jt., 2012).



Joonis 6. Metüülrühma ülekanne. DNA metülatsioon esineb siis, kui tsütosiini pürimidiini 5' positsioonis olevale süsinikule lisatakse metüülrühm. Protsessi viivad läbi metüültransferaasid (DNMT). Metüülrühma doonor on S-adenosüülmetioniin (SAM) ja ülekande kofaktor S-adenosüülhomotsüsteiin (SAH). (kohandatud, Day ja Sweatt, 2010)

Imetajatel on ~28 miljonit CpG saiti, mis on jaotunud üle genoomi. Leidub regioone, kus neid on hõredamalt, kus tihedamalt. CpG rikkaid kohti genoomis nimetatakse CpG saarteks. Üle genoomi on selliseid regioone arvestuslikult ~30 000, mis võivad olla pikkusega 500-2000 aluspaari (Craig ja Bickmore, 1994). Enamasti asuvad nad geenide promootorpiirkonna läheduses ja on harva metüleeritud (Rakyan jt., 2011; Irizarry jt., 2009). Lisaks on CpG saartega külgnevad alad, mida kutsutakse CpG kaldad ja CpG rannikud, mis asuvad < 2000 aluspaari eemal CpG saarekesi. Metülatsioon neis piirkondades arvatakse olevat erinevates kudedes varieeruvam kui CpG saarekestes, kuigi nende regioonide CpG saitide sisaldus on väiksem. (Ziller jt., 2013)

Metülatsioonimuster kudede vahel varieerub (Rakyan jt., 2011). Sõltuvalt kromosoomi piirkonnast, rakutüübist ja arengustaadiumist võib CpG sait olla kas metüleeritud, hemimetüleeritud või metüleerimata (Reinius jt., 2012). Hemimetülatsiooniks nimetatakse olukorda, kus CpG sait on metüleeritud ainult ühel DNA ahelal alleeli kohta. Kui DNA metülatsioon on muutunud mitmes üksteisele lähedal asuvas CpG saidis, siis seda nimetatakse erinevalt metüleeritud regiooniks (ing k. DMR - *Differentially Methylated Region*). Enamasti on need <1000 aluspaari, aga võivad ulatuda ka 1 miljoni aluspaarini (Frigola jt., 2006). Kõrge geeniekspressiooni tasemega piirkond kromatiinis on vähem metüleeritud ning

metüleeritud DNA on tihedamini kokku pakitud passiivse kromatiini olekusse (Razin ja Cedar, 1977). Sageli on metülatsioonimuster erinevate haiguste puhul muutunud, näiteks vähi (Busche jt., 2013; (Kleinman jt., 2014), Alzheimeri tõve (Lu jt., 2013), reumatoidartriidi (Liu jt., 2013) ja hulgiskleroosi (Sawcer jt., 2012) korral. DNA metülatsioon on oluline organismi normaalseks arenguks ja erinevate rakuliste protsesside kontrollis nagu embrüonaalne areng (Bock, 2012), X kromosoomi inaktivatsioon (Sharp jt., 2011), genoomne imprinting (Barlow, 2011), koespetsiifiline geeniekspressiooni säilitamine ja vananemine (Marioni jt., 2016).

1.8. Meetodid DNA metülatsiooni mõõtmiseks

Koe- ja ajaspetsiifiline geeniekspressioon, mis on oluline erinevate haiguste väljakujunemisel, on reguleeritud epigeneetiliselt ning DNA metülatsioonil on selle regulatsioonis tähtis roll. Seetõttu on lühikese aja jooksul arendatud palju erinevaid meetodeid, nii teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogial põhinevaid kui spetsiaalselt disainitud kiibid, metülatsioonimustri profiilimiseks. Esile toon enimkasutatud ja parimaid tulemusi andvad meetodid ülegenoomseks metülatsioonitaseme detekteerimiseks: spetsiaalselt disainitud metülatsioonikiip Infinium HumanMethylation450 BeadChip, DNA immunosadestamine ja sekveneerimine (MeDIP-seq - *Methylated DNA ImmunoPrecipitation Sequencing*), vähendatud-esindatusega bisulfiti sekveneerimismeetod (RRBS - *Reduced-Representation Bisulfite Sequencing*) ja kogu genoomi bisulfiti sekveneerimismeetod (WGBS - *Whole-genome bisulfite sequencing*).

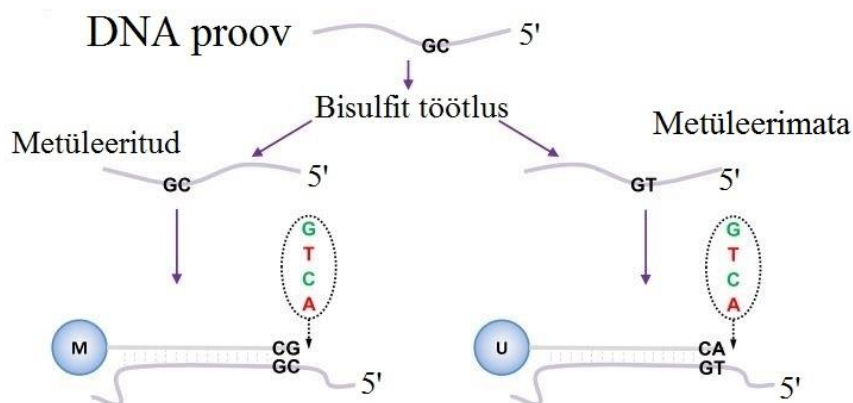
1.8.1. Metülatsioonikiip *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit*

Üks metülatsiooni määramiseks parimaid ja enimkasutatavaid kiipe on *Infinium HumanMethylation450K BeadChip Kit*, edaspidi Illumina 450K metülatsioonikiip, mille abil on võimalik määrata 485 577 CpG saidi metüleerituse taset inimese genoomis (Illumina Inc.).

See kiip baseerub keemilisel meetodil, kus DNAd bisulfitiga töödeldes on võimalik konverteerida tsütosiin uratsiiliks ja see omakorda tümiiniks. Metüleeritud tsütosiini nukleotiid jääb muutumatuks (Frommer jt., 1992).

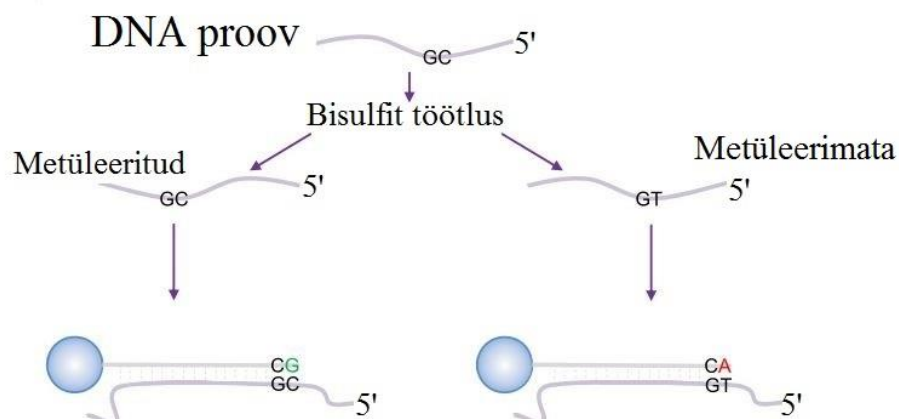
Iga CpG saidi metülatsioonitaseme hindamiseks kasutatakse 50 nukleotiidi pikkuseid Infinium tüüp I ja tüüp II disaini proove (Maksimovic jt., 2012). Tüüp I proovide disain kanti Illumina450K kiibile vanemalt HumanMethylation27 BeadChip kiibilt. Ühe CpG lookuse jaoks kasutatakse kahte disainitud proovi, üks metüleeritud ja teine metüleerimata lookuse

jaoks (M ja U). Kummagi proovi seondumist jälgitakse ühe aluspaarilise pikendamisega, mille tulemuseks on fluorestseeruvalt märgistatud nukleotiidi lisamine (Joonis 7). (Maksimovic jt., 2012)



Joonis 7. Infinium I tüüpi proov. Kui CpG sait on metüleeritud, jääb DNA fragment peale bisulfiti töötlust mittekonverteerituks ja seondub komplementaarse metüleeritud prooviga (M), mis termineerub 3' ahela lõpus tsütosiiniga. Kui CpG sait on mittemetüleeritud, toimub seondumine komplementaarse mittemetüleeritud prooviga (U) ning termineerub 3' ahela lõpus tümiiniga. (kohandatud, Maksimovic jt., 2012)

Infinium tüüp II kasutab ainult ühte proovi ühe CpG saidi kohta. Metülatsioonitase detekteeritakse ühealuspaarilise pikendamise kaudu sõltuvalt C nukleotiidi positsioonist sihtmärk-CpGs, mille tulemuseks on G või A nukleotiidi lisamine, mis on komplementaarsed vastavalt kas siis metüleeritud C-ga või mittemetüleeritud T-ga. Iga lookus detekteeritakse kahe värviga ning metülatsioonitase samalt positsioonilt väljendatakse võrreldes neid kahte värvsignaali (Joonis 8). (Maksimovic jt., 2012)



Joonis 8. Infinium II tüüpi proov. Metülatsioonitase detekteeritakse ühealuspaarilise pikendamise kaudu sõltuvalt C nukleotiidi positsioonist sihtmärk-CpGs. Metülatsioonitaset vastavas lookuses võrreldakse kahe värvsignaali abil (punane ja roheline). (kohandatud, Maksimovic jt., 2012)

Metülatsioonitase uuritavas CpG lookuses väljendatakse Infinium tüüp I ja tüüp II disaini puhul beeta-väärtusena, mis väljendab metüleeritud tsütosiinide osakaalu kõikide tsütosiinide hulgas (Bibikova jt., 2011).

1.8.2. DNA immuunosadestamine ja sekveneerimine

DNA immuunosadestamine ja sekveneerimine (MeDIP-seq - *Methylated DNA ImmunoPrecipitation Sequencing*) on ülegenoomne meetod metüleeritud DNA järjestuste analüüsimiseks. Metüleeritud DNA sadestatakse, kasutades 5mC-ga seonduvat antikeha ning puhastatud metüleeritud genoomi fragmendid sekveneeritakse. Esimest korda kirjeldasid immuunosadestamismeetodit Weber jt., (2005) ning Maunakea jt., (2010), täiustades seda tehnikat, kombineerides MeDIP meetodi järgmise põlvkonna sekveneerimismeetoditega.

Meetod on hea, kuna võimaldab kiiresti uurida kõiki CpG saite üle genoomi ning on suurte valimite juures oluliselt odavam kui ülegenoomne bisulfiti sekveneerimismeetod. Üks suuremaid miinuseid selle meetodi juures on aga see, et analüüs ei ole ühenukleotiidilise täpsusega, vaid saadakse teatud piirkonna keskmine metülatsioonitase.

1.8.3. Ülegenoomne bisulfiti sekveneerimismeetod

Areng kõrge lahutusvõimega tehnoloogiates on muutnud võimalikuks määrata kogu DNA metüloom bisulfiti töötamise ning sellele järgneva kogu genoomi sekveneerimise abil. Cokus jt., (2008) kirjeldasid esimesena ülegenoomset bisulfiti sekveneerimismeetodit (WGBS - *Whole-Genome Bisulfite Sequencing*) *Arabidopsis thaliana* näitel ja Lister jt., (2009) määrasid esimesena inimese DNA metüloomi embrüonaalsetes tüvirakkudes. Antud meetod võimaldab tsütosiinide metülatsiooni mõõtmist üle genoomi ühenukleotiidilise täpsusega, mis on esile toonud keerukad metülatsioonimustrid ning varieeruvuse (Lister jt., 2009).

Sarnaselt teistele sekveneerimismeetoditele on WGBS toorandmeteks lühikesed lugemid, mis joondatakse ning analüüsitakse. Iga CpG saidi kohta saab arväärtuse metülatsiooni näitavate ja antud CpG saite katvate lugemite kohta. Nende väärtuste suhe annab CpG saidi metülatsiooni taseme (Wu jt., 2015).

Ülegenoomsel bisulfiti sekveneerimise meetodil on kõige vähem piiranguid metülatsiooni profiilimiseks, kuid paljude tööühmade jaoks on see meetod kallis, eriti kui on vaja analüüsida suur hulk proove. Sellepärast on välja arendatud vähendatud genoomi esindatusega meetod, mis vähendab sekveneerimiskulu proovi kohta.

1.8.4. Vähendatud esindatusega bisulfiti sekveneerimismeetod

Vähendatud esindatusega bisulfiti sekveneerimismeetod (RRBS - *Reduced-Representation Bisulfite Sequencing*) on kõrge resolutsiooniga meetod uurimaks genoomi metülatsooniprofiili ühenukleotiidilise täpsusega. Meetod, mida kirjeldasid esimesena Meissner jt., (2005), põhineb restriksioonifragmentide suuruse selektsioonil, mille tulemusena eemaldatakse genoomist järjestused, mis ei sisalda CpG saite, ning sekveneeritakse 1% genoomist, mis CpG saite sisaldab. Antud tehnika kombineerib omavahel restriksiooniensüümid ja bisulfiti sekveneerimise, et rikastada genoomis CpG dinukleotiidide rikkad kohad. RRBS meetodiga on võimalik katta üle genoomi rohkem kui 5 miljonit CpG saiti.

1.8.4.1. Kokkuvõttev tabel metülatsoonitaseme mõõtmismeetoditest

Tabelis 2 on eelpool käsitletud metülatsoonitaseme mõõtmismeetodeid omavahel võrreldud: meetodi põhimõte, vajalik alg-DNA kogus, kui mitme aluspaarilise täpsusega saab tulemuse, teoreetiline ning tegelik kattuvus ja mitu lugemist on Illumina proovi kohta.

Tabel 2. Ülegenoomsete DNA metülatsoonimustri profiilimiste tehnoloogiate võrdlus. (kohandatud, Gu jt.,2011)

Meetod	Millel baseerub	Vajalik DNA kogus (µg)	Maksimaalne resolutsioon (aluspaarides)	Teoreetiline kattuvus	Tegelik kattuvus	Lugemeid proovi kohta
Illumina 450K	Bisulfiti meetod	0,5	1	1%	1%	Kiibil põhinev
MeDIP-seq	DNA immuunosadestamine ja sekveneerimine	0,3-5	> 100	100%	9%	~50milj
RRBS	Bisulfiti meetod + sekveneerimine	0,01-03	1	10%	9%	~10milj
WGBS	Bisulfiti meetod + sekveneerimine	0,05-0,1	1	100%	> 90%	> 500milj

1.9. Telomeerid ja metülatsioon

Inimese vananemisel toimuvad muutused nii raku kui molekuli tasemel, nagu näiteks telomeeride lühenemine ja muutused geeniekspressioonis. Epigeneetiline muster muutub eluea jooksul, mistõttu arvatakse, et epigeneetilised muutused võivad vananemise kui protsessi juures väga olulist rolli mängida. Viimasel ajal on hakatud rohkem uurima DNA metülatsiooni ja vanuse vahelisi seoseid eluea jooksul ning praeguseks seostatakse ala- ja ülemetülatsiooni organismi vananemisega (Koch jt., 2013; Bell jt., 2012). On leitud, et kui telomeerid lühenevad, siis metülatsioonitase paljudes geenipromootorite subtelomeersetes alades võib muutuda, mis omakorda võib põhjustada muutusi geeniekspressioonis, mis suurendab riski vanusest sõltuvate haiguste tekkeks (Buxton jt., 2014). Näiteks on progresseeruvat metülatsioonikadu kirjeldatud juba 1983. aastal fibroblastide puhul (Wilson ja Jones, 1983) ja 1987. aastal vananevates loomades (Wilson jt., 1987) ning samasuguseid seoseid on leitud ka tänapäeval (Gonzalo, 2010; Calvanese jt., 2009).

CpG saarte metüleerimine mõjutab paljusid geene, näiteks östrogeeni retseptorit kodeerivat geeni, kus Issa jt., (1994) näitasid, et metülatsioon on seotud östrogeeni *ER* geeni mahasurumisega soolevähi arenenemisel (Issa jt., 1994). Kõrget metülatsioonitaset on veel kirjeldatud mitmetes geenipromootorites (Fraga, 2009; Fraga ja Esteller, 2007). Kuna vananemine arvatakse olevat üks tähtsamaid riskifaktoreid kasvaja kujunemiseks, siis CpG saarte ülemetüleeritus võib vaigistada kasvajaid allasuruvaid geene (Jones ja Baylin, 2002) ning see võib olla üks faktoritest, miks osadel inimestel areneb välja pahaloomuline kasvaja (Jones ja Laird, 1999; Toyota ja Issa, 1999).

Buxton jt., (2014) leidsid 65 geenipromootorit, mis sisaldasid saite, mis olid seotud telomeeride pikkusega, mis on erinevad lookustest, kus metülatsioonitaset varasemalt vanusega seotud on (Horvath, 2013; McClay jt., 2013; Heyn jt., 2012). McClay jt., (2013) on kirjeldanud 70 erinevalt metüleeritud DNA regiooni metülatsiooni muutust vananemisel, kus 42 olid alametüleeritud ja 28 ülemetüleeritud. Ülemetüleeritud saidid olid pigem CpG saarekestel ja kallastel ning alametüleeritud DMRid pigem regulatoorsete valkude või histoonide modifikatsioonidega seotud regioonides (McClay jt., 2013).

CpG saidid, mis ei asu promootorregioonides, on vananedes üldiselt ülemetüleeritud ja arvatakse, et need muutused DNA metülatsioonis võivad olla markeriks nii kronoloogilisele kui bioloogilisele vanusele (Bustos jt., 2014). Sama on välja pakkunud varasemalt ka Horvath jt., (2013), et DNA metülatsioon mõõdab epigeneetilise efekti säilitamist, ja et seda

epigeneetilist kella saaks kasutada arengubioloogias kasvajate ja vananemise uuringutes (Horvath jt., 2013).

1.10. Üle-epigenoomne assotsiatsiooniuuring

Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (GWAS - *Genome-Wide Association Studies*) on olnud äärmiselt edukad identifitseerimaks erinevaid geneetilisi variatsioone, mis on seotud erinevate haiguste esinemisega nagu diabeet või südamehaigused (Visscher jt., 2012). Leidmaks veel erinevate haiguste seni teadmata pärilikkust (ing. k. *missing heritability*), uuritakse epigeneetilist varieeruvust, et leida seoseid vaadeldava tunnuse või haiguse vahel üle-epigenoomse assotsiatsiooniuuringu abil (EWAS - *Epigenome-Wide Association Studies*) (Rakyan jt., 2011). DNA CpG saitide metülatsioon on hetkel kõige lihtsamini uuritav epigeneetiline modifikatsioon, mida EWAS abil uurida. Selle põhjal saab teada, millised genoomi piirkonnad on konkreetse haiguse puhul erinevalt metüleeritud ning edaspidi on võimalik uurida võimalikke haigusega seotud geene nendes piirkondades. Analüüsi läbiviimiseks sobivad nii sekveneerimisel kui mikrokiibil põhinevate profiilimistehnoloogiate andmed. (Rakyan jt., 2011)

Kui GWAS puhul sobivad geneetilise variatsiooni identifitseerimiseks enamus koetüüpe, siis EWAS puhul tuleb arvestada, et haigusega seotud epigeneetiline variatsioon võib olla koe- või arengufaasi spetsiifiline ning võib ajas muutuda. Konkreetse koeproovi uurimisel mängib olulist rolli ka koe heterogeensus. Näiteks veri koosneb rohkem kui 50-st erinevast rakutüübist ja kui haigusega seotud variatsioon on väheesindatud rakutüübis, võib muutus märkamata jääda.

Tulemuste analüüsil tuleks kindlasti silmas pidada, et seosed, mis metülatsioonitaseme muutustes leitakse, võivad olla nii haiguse tagajärjel tekkinud kui haigust põhjustanud. Arusaamine, kas epigeneetiline varieeruvus võib olla haiguse protsessi põhjustav faktor, on hädavajalik, et leida haigusega seotud muutuste funktsionaalne roll.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Magistritöö eksperimentaalses osas eesmärk on läbi viia EWAS leidmaks seoseid DNA metülatiooni ja telomeeride pikkuste vahel.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Valimi kirjeldus

Valim koosneb Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu geenidonoritest. Telomeeride mõõtmist teostati 844 indiviidil (401 naist ja 443 meest; vanuses 18-84 eluaastat) ning 757-l olid olemas metülatiooni profiilid mõõdetud Illumina 450K metülatatsioonikiipi kasutades. Lõppvalimi suurus oli 747 indiviidi, kellel olid olemas kvaliteetsed telomeeri ja metülatiooniandmed. Kokku koosneb lõppvalim seitsmest osavalimist, mille ülevaade on toodud ära tabelis 3 ja 4.

Tabel 3. Kokkuvõttev tabel, mille järgi individid osavalimitesse valiti.

Osavalim	Valimi valikukriteeriumid
Valim1	Pole kunagi suitsetanud; $KMI \leq 30$; kuni 40. aasta vanused; astma diagnoosiga
Valim2	Valim1 indiviididele vastavad kontrollid, valitud soo, vanuse ja KMI põhjal
Valim3	Valitud 50 „tervet“ noort (23-34 aastat) ning 50 „tervet“ eakat (73-84) nende hulgast, kellel on kahe ajapunkti andmed
Valim4	Juhuvalim kahe ajapunktiga indiviidide valimist nii, et kõik vanusgrupid oleksid esindatud; mehi ja naisi võrdselt
Valim5	Valim indiviididest, kes viie aasta jooksul pärast biopangaga liitumist on saanud eesnäärmevähi diagnoosi (Eesti vähiregistri põhjal); vanus liitudes 30-79 aastat; varem ei ole olnud hea- ega pahaloolumulisi kasvajaid; hetkel mittesuitsetajad
Valim6	Valim5 indiviididele vastavad kontrollid, kes viie aasta jooksul pärast biopangaga liitumist ei saanud eesnäärmevähi diagnoosi; vanus liitudes samas vanusgrupis (vanusgrupp defineeritud viie aastaste vanusvahemike kaupa); sama KMI grupp; varem ei ole olnud hea- ega pahaloolumulisi kasvajaid, hetkel mittesuitsetajad
Valim7	Valim indiviididest, kes surid vähki viie aasta jooksul pärast biopangaga liitumist (Eesti surmaregistri põhjal); vanus liitudes 40-89; varem ei ole olnud vähidiagnoosi olnud

Tabel 4. Praktilise osa läbiviimisel kasutatud osavalimite kirjeldus. Tabelis on ära toodud osavalimite suurus, meeste ja naiste osahulk valimis, osavalimite keskmine vanus (ja standardhälve), keskmine kehamassiindeks (KMI), osavalimite indiviidide suitsetamise staatus ning indiviidide arv, kellel olid telomeerid mõõdetud.

Kirjeldatav tunnus	Valim1	Valim2	Valim3	Valim4	Valim5	Valim6	Valim7
Valimi osa suurus	91	82	97	315	48	48	76
Mehed/Naised (%)	33/58 (36,3%/63,7%)	29/53 (35,4%/64,6%)	48/49 (49,5%/50,5%)	158/157 (50,2%/49,8%)	48/0 (100%/0%)	48/0 (100%/0%)	38/38 (50,0%/50,0%)
Keskmine vanus (SD)	26,1 (7,1)	26,4 (6,8)	52,7 (23,7)	50,3 (16,9)	66,4 (4,7)	66,4 (4,7)	64,8 (9,4)
Keskmine KMI (SD)	22,9 (3,0)	22,7 (2,9)	26,7 (5,1)	27,4 (5,6)	27,8 (3,0)	27,7 (3,3)	27,6 (4,8)
Suitsetamise staatus	91/0/0	82/0/0	61/23/13	164/95/56	28/20/0	25/23/0	34/8/34
Telomeerid mõõdetud**	90	81	97	310	47	48	74

*Suitsemise staatus: mitte kunagi/endised/praegused suitsetajad

**Erindlikud väärtused Hampel'i testi põhjal välja jäetud

2.2.2. Telomeeride mõõtmine ja saadud andmete eeltöötlus

Telomeeride suhtelise pikkuse mõõtmine viidi läbi reaala PCR meetodil, kasutades 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat, ja saadud tulemused analüüsiti SDS 2.4 (Applied Biosystems) ja MS Excel (2010) tarkvara kasutades.

Telomeeride suhtelise pikkuse mõõtmiseks kasutati amplifikatsioonikontrollina 36B4 ühekoopiageeni. Ühekoopiageeni ja telomeeride pikkuse suhet võrreldi standard-DNA vastu, mille telomeeride suhteline pikkus oli varasemalt kindlaks määratud (Leicester, UK). Standard-DNAst tehti viiest lahjendusest koosnev seeria kontsentratsioonide vahemikus 3-30ng/μl, kasutades 1x TE puhvrit.

Reaala PCR viidi läbi iga proovi kohta kaks korda, nii telomeeride amplifikatsiooni võrdlemiseks standard-DNaga (T katse) kui ka ühekoopiageeni amplifikatsiooni võrdlemiseks standard-DNaga (S katse). Reaala PCR reaktsioonisegu valmistati järgnevalt:

- 10 μl Maxima SYBR Green/Rox Q-PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific)
- T katse: 0,5 μl (tel1b)/0,5 μl (tel2b) T praimeritepaar lõppkontsentratsiooniga 300nM
- S katse: 0,5 μl (36B4F)/1 μl (36B4R) S praimeritepaar lõppkontsentratsiooniga vastavalt 300nM/500nM
- 3 μl DNA kontsentratsiooniga 10 ng/μl
- 6 μl (T)/5,5 μl (S) nukleasivaba H₂O

Kõik praimerid olid kõrgefektiivse vedelikkromatograafia meetodil puhastatud ning praimerite järjestused on ära toodud tabelis 5.

Tabel 5. Töös kasutatud DNA praimerid

Praimeri nimetus	Praimeri 5'→3' järjestus	Praimeri pikkus aluspaarides
tel1b	CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	39
tel2b	GGCTTGCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCT	39
36B4F	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	24
36B4R	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	25

Analüüside läbiviimiseks kasutati 384 positsiooniga Q-PCR plaate (Applied Biosystems), kuhu kanti standard-DNA 5 lahjendust, negatiivne kontroll ja 90 uuritavat proovi. Kõik

proovid mõõdeti neljas korduses. Varieeruvuse vähendamiseks pipeteeriti samade uuritavate proovide T ja S katsete reaktsiooniplaadid vahetult üksteise järel ning Q-PCR reaktsioonid viidi läbi samal päeval.

Termotsükkel T ja S katse amplifikatsiooni jaoks viidi läbi järgmiselt:

- denaturatsioon 10 minuti jooksul 95°C juures
- T katse: 15 sek 95°C ja 1 min 58°C - 20 tsüklit
- S katse: 15 sek 95°C ja 1 min 58°C - 30 tsüklit

Kõikide uuritavate proovide puhul määrati pärast reaalaaja PCR läbiviimist SDS 2.4 tarkvara abil C_t , mille võrdlemisel standard-DNA lahjendusrea põhjal moodustatud standardsirgega määrati igale proovile arvutuslik kontsentratsioon.

Telomeeride suhtelise pikkuse määramiseks jagati omavahel sama uuritava proovi T katses saadud keskmine arvutuslik kontsentratsioon S katses saadud keskmise arvutusliku kontsentratsiooniga. Enne keskmiste suhteliste kontsentratsioonide arvutamist määrati iga proovi 4 korduse C_t väärtuste standardhälve. Kui see ületas 0,2, eemaldati analüüsides suurim kõrvalekalduja ning määrati uuesti C_t väärtuste standardhälve. Kui standardhälve ka sellisel juhul oli suurem kui 0,2, määrati proov kordusanalüüsi.

Saadud telomeeride suhtelised pikkused (T/S) on dimensioonita väärtused, mis kajastavad uuritava proovi telomeeride ja ühekoopiageeni amplifikatsioonide suhet võrreldes standardina kasutatud proovi telomeeride ja ühekoopiageeni amplifikatsiooni suhtega.

Oluline on saadud andmete kvaliteedi ja õigsuse hindamine. T/S tulemuste jaotust analüüsides osutus vajalikuks andmed naturaallogaritmida, et andmete jaotus oleks lähedasem normaaljaotusele.

Erindlike väärtuste leidmiseks kasutati Hampeli testi, mis põhineb robustsel varieeruvuse hinnangul. Hampeli testi (Chrominski ja TKACZ, 2010) kohaselt on i -nda indiviidi telomeeri pikkuse väärtus erindlik, kui

$$r_i = x_i - Me$$

$$|r_i| = 4,5 \times Me_{|r|},$$

kus Me on telomeeri pikkuste mediaan üle kõikide mõõtmiste, x_i on i -nda indiviidi telomeeri pikkus, r_i on i -nda indiviidi telomeeri pikkuse erinevus mediaanist, nn hälve, ning $Me_{|r|}$ on hälvete absoluutväärtuse mediaan. Hampeli test viidi läbi iga plaadi korral eraldi R tarkvara (versioon 3.2.2) kasutades.

2.2.3. DNA metülatsiooni andmete eeltöötlus

DNA metülatsiooni andmete eeltöötlus ja kvaliteedi kontroll viidi läbi tarkvaraga R (versioon 3.2.2), kasutades Bioconductor'i paketti *minfi* (Aryee jt., 2014). HiScanSQ (Illumina Inc.) masinast saadud rohelise ja punase signaali intensiivsuste failidele tehti taustasignaali suhtes korrigeerimine ning konverteerimine metüleeritud (M) ja mittemetüleeritud (U) signaaliks. Metülatsiooni beeta-väärtused arvutati järgmise valemi põhjal: $beeta = M/(M + U + 100)$. Järgmiseks teostati beeta-väärtuste põhjal andmete normaliseerimine, kasutades kvantiilnormaliseerimisel põhinevat kiibisisest meetodit SWAN (*Subset-Quantile Within Array Normalization*) (Maksimovic jt., 2012), et muuta tüüp I ja tüüp II proovide andmed võrreldavaks.

Analüüsist eemaldati CpG saidid, mis 1) ei ole eristatavad taustasignaalist (detektsiooni p -väärtus $> 0,01$ rohkem kui 5% indiviidide korral, lisaks eemaldati iga beeta-väärtus, mille korral detektsiooni p -väärtus $> 0,01$; 2) on varem teadaolevate ristreaktiivsete (ing. k. *cross-reactive*) proovidega mõõdetud (Chen jt., 2013); 3) asuvad X ja Y kromosoomil; 4) on polümorfseid või mille ahela pikendamise positsioonis on polümorfism.

Analüüsist eemaldati indiviidid, kelle puhul 1) detekteeritavate CpG saitide osakaal on $< 95\%$; 2) fenotüübi andmestikus märgitud sugu ei vasta sugukromosoomide metülatsioonimustritele.

2.2.4. Üle-epigenoomne assotsiatsiooniuuring

DNA metülatsiooni ja telomeeri pikkuste üle-epigenoomse assotsiatsiooniuuringu läbiviimiseks kasutati mitmese regressiooni mudelit. Mudelit kohandati uuritavat tunnust mõjutavate bioloogiliste tunnuste ning teadaolevate mittebioloogiliste tunnuste nn segavate tehniliste faktorite suhtes, selleks et paremini kirjeldada otsest telomeeride pikkuse ja DNA metülatsiooni seost.

Segavate tehniliste faktoritena võeti arvesse Q-PCR plaat, millel proovid töödeldi, ning metülatsiooni proovi kiibi tunnus ning positsioon kiibil. DNA metülatsiooni mõjutavate fenotüübiliste tunnustena võeti arvesse soo, vanuse, KMI ja suitsetamise staatuse mõju. Suitsetamise staatuse puhul eristati mitte kunagi suitsetajaid, endiseid suitsetajaid ja hetkel suitsetavaid indiviide. Lisaks oli mudel korrigeeritud kuue suurema vereraku tüübi (CD4, CD8, loomulikud tapjarakud, B-rakud, monotsüüdid, granulotsüüdid) osakaalude suhtes, mis

on hinnatud Houseman jt., (2012) algoritmi põhjal, et võtta arvesse vererakkude erinevat metülatsiooniprofiili.

Statistilised analüüsid viidi läbi kasutades R tarkvara (3.2.2).

2.2.5. Meta-analüüs

Meta-analüüs on hulk meetodeid, mis lubavad mitmete sarnaste EWAS uuringute andmevalimeid kombineerides suurendada optimaalset võimsust, et leida uusi haigusseoselisi geene (Han ja Eskin, 2012).

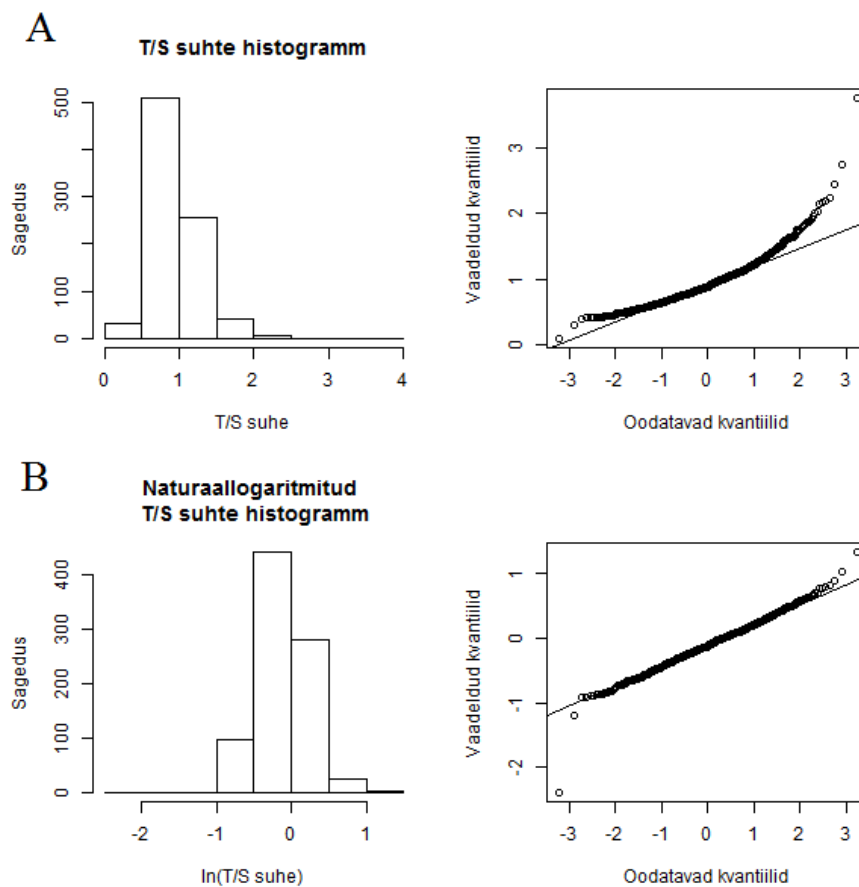
Meta-analüüsis ühildati erinevate valimite EWAS analüüside tulemused, kasutades Mägi ja Morris., (2010) poolt väljatöötatud programmi GWAMA (*Genome-Wide Association Meta-Analysis*). Esmalt viidi läbi fikseeritud mõjudega pöörd-kaaludega meta-analüüs. Hindamaks, kas iga valimi korral on tegelik efektisuurus ühesugune, kasutati Q ja I^2 statistikud, millest esimese abil saab hinnata tõelise heterogeensuse olemasolu valimite vahel, ja I^2 hindab tõelise heterogeensuse määra kogu varieeruvusest efektisuuruste osas. Tõelise heterogeensuse korral valimite vahel viidi läbi juhuslike mõjudega pöörd-kaaludega meta-analüüs.

3. Tulemused

Käesolevas töös määrati telomeeride suhteline pikkus ning analüüsiti nende seost CpG saitide DNA metüülatsioonitasemetega.

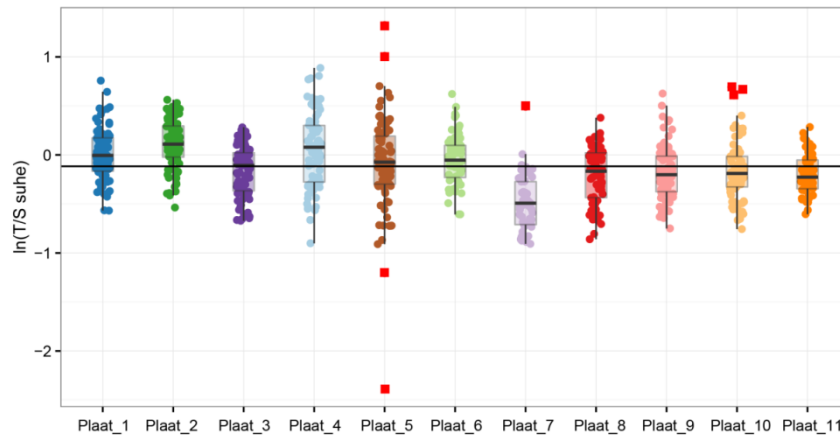
3.1. Andmete eeltöötlus

Käesoleva magistritöö raames mõõdeti 844 indiviidi suhteline telomeeride pikkus reaallaja PCR meetodiga. Andmed naturaallogaritmiti (Joonis 9).



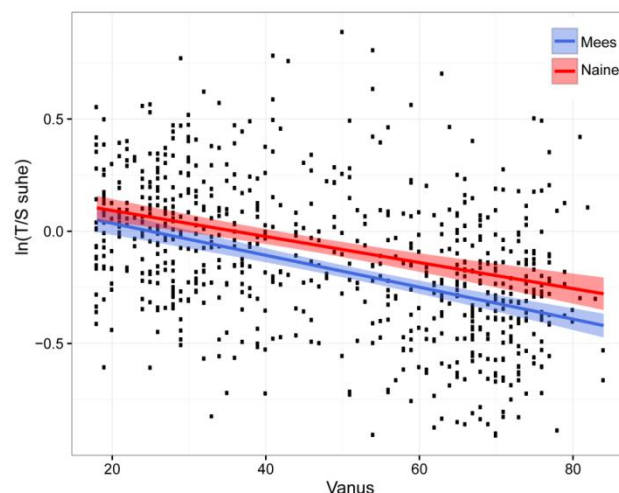
Joonis 9. Telomeeride suhtelise pikkuse väärtuste jaotuse illustreerimine histogrammil ja kvantiil-kvantiil joonisel. Histogrammide x-teljel: (A) T/S suhte väärtused, (B) naturaallõgareeritud T/S suhte väärtused; y-teljel sagedus. Kvantiil-kvantiil joonise x-teljel on kujutatud oodatud normaaljaotuse kvantiile ning y-teljel vaadeldud kvantiile. (A) Graafikul on näha, et andmed ei ole normaaljaotusega. (B) Naturaallõgareeritud andmed on normaaljaotusele lähedased, ent näha on üksikuid erindlikke punkte.

Hampel meetodit kasutades eemaldati andmestikust 8 erindlikku proovi (Joonis 10). Edasistes analüüsidesse kaasati 836 kvaliteetsete suhteliste telomeeride pikkuste väärtustega proovi.



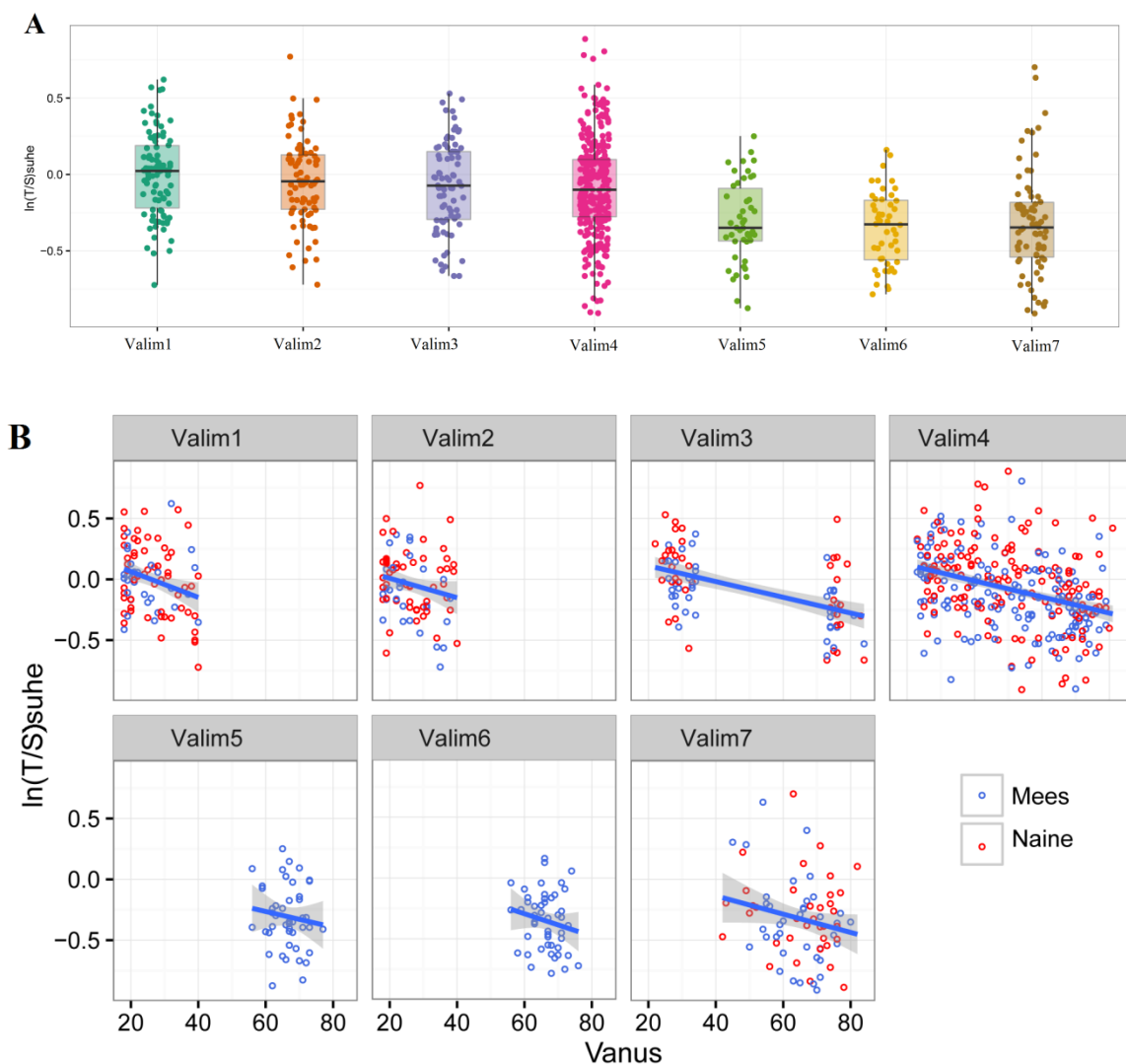
Joonis 10. Karp-vurrud diagramm iseloomustamaks telomeeride pikkuse suhtelist jaotust katses kasutatud Q-PCR plaatide lõikes. Punaste kastidega on toodud ära Hampel'i meetodiga eristunud 8 proovi, mis edasistest analüüsides välja jäeti. Karp-vurrud diagrammi puhul on tumeda joonega näidatud mediaan, kasti ülemine joon tähistab ülemist kvartiili ja alumine alumist kvartiili. Nn vuntside ulatus jääb vahemikku 3-kordne kvantiilivahemik, x -teljel on ära toodud kasutatud Q-PCR plaadid ning y -teljel naturaallogaritmitud T/S suhe.

Selleks, et selgitada välja lõppvalimisse jäänud proovide telomeeride suhtelise pikkuse õigsust ning tulemustest saadud seost võrdlesime varem kirjandusest teadaolevaga. Joonisel 11 on nii meeste (sinine) kui ka naiste (punane) puhul näha laskuvat trendijoont, mis näitab, et telomeeride pikkus on negatiivselt seotud vanusega (Blackburn, 2001). Antud andmed toetavad ka varem teadaolnud fakti, et naiste telomeerid on keskmiselt pikemad kui meeste telomeerid (Huntj t., 2008).



Joonis 11. Hajuvusgraafik telomeeride suhtelise pikkuse ja vanuse vahel. Joonisel iga kastike tähistab ühte indiviidi, x -teljel on toodud vanus ja y -teljel naturaallogaritmitud T/S suhe. Sinise ja punase joonega on tähistatud vanuse ja telomeeri pikkuse vahelist keskmist seost ning varjundiga keskmise usaldusvahemik lineaarse mudeli põhjal, vastavalt meeste ja naiste puhul.

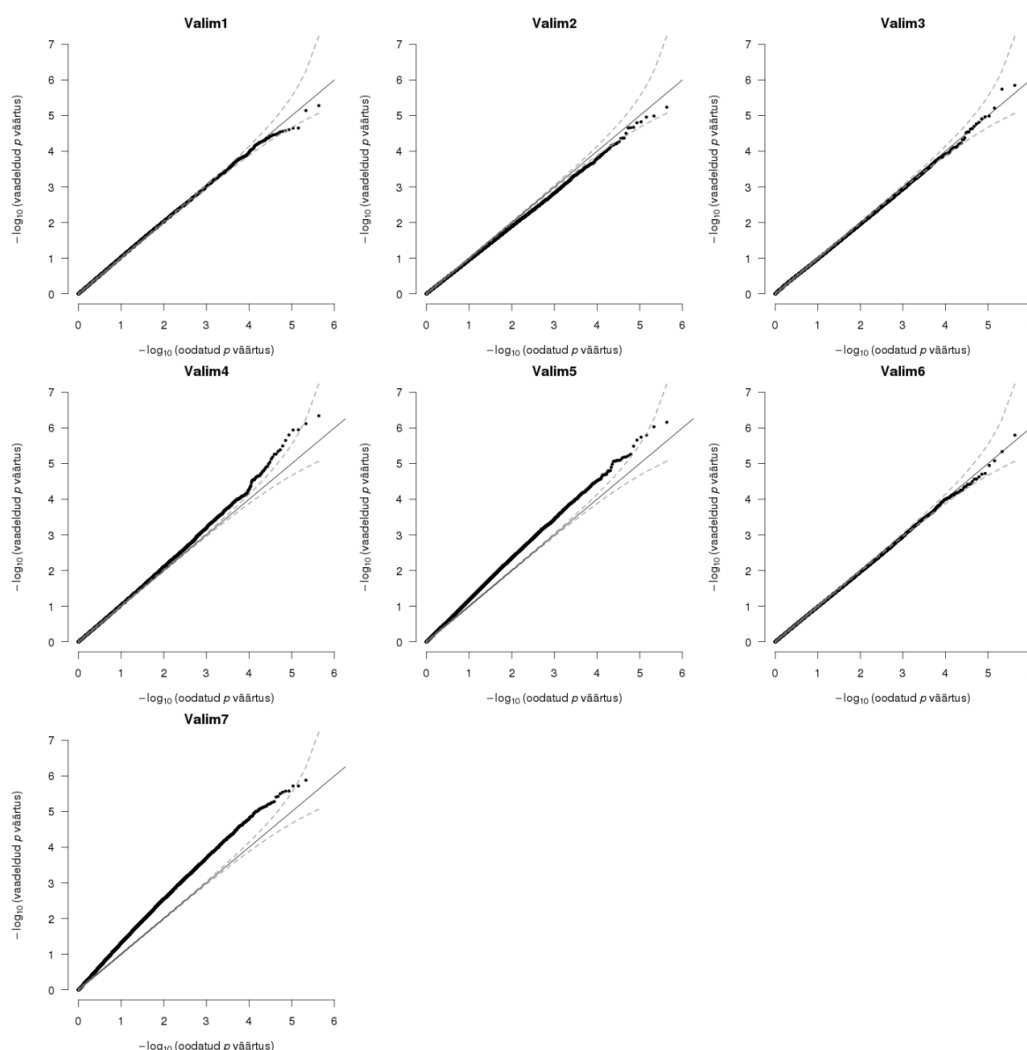
Regressioanalüüsi lõppvalimisse kaasati 747 indiviidi, kellel on olemas nii kvaliteetsed metülatiooni andmed kui ka mõõdetud suhteline telomeeride pikkuse väärtus. Lõppvalim koosneb seitsmest osavalimist, millel kõigil on erinev vanuseline ja sooline jaotus. Erinevate osavalimite vanuse ja naturaallogaritmide T/S suhte seos on ära toodud alloleval joonisel, kus on näha, et osavalimid on erinevate vanusgruppide jaotusega (Joonis 12).



Joonis 12. Lõppvalimi osavalimite telomeeride keskmise pikkuse seos vanusega. (A) Karp-vurrud diagramm iseloomustamaks telomeeride suhtelist jaotust osavalimite lõikes. Tumeda joonega on märgitud mediaan, kasti ülemine joon tähistab ülemist kvartiili ja alumine alumist kvartiili. Nn vuntside ulatus jääb vahemikku 3-kordne kvantiilivahemik, x -teljel on toodud ära seitse osavalimit ning y -teljel naturaallogaritmide T/S suhe (B) Hajuvusdiagramm naturaallogaritmide telomeeride suhtelise pikkuse ja indiviidi vanuse vahel. Joonisel on toodud ära trendijoon, mis tähistab vanuse ja telomeeri pikkuse vahelist keskmist seost, varjutatud hall osa näitab keskmise usaldusvahemikku lineaarse mudeli põhjal, x -teljel on toodud vanus ning y -teljel naturaallogaritmide T/S suhe. Punaste täppidega on kujutatud naiste ja sinisega meeste proove.

3.2. Andmeanalüüs

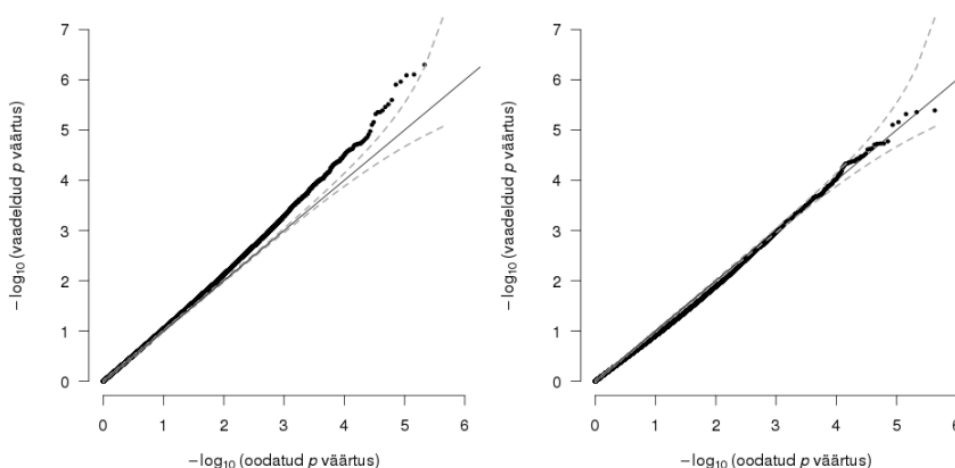
Kuna eelnevalt mõõdetud telomeeride suhtelise pikkuse väärtused korreleeruvad vanuse ja sooga, on andmed sobilikud edasistes analüüsides kasutamiseks. Selleks uurisime 427 278-429 724 CpG saitide metüleerituse seost mõõdetud suhtelise telomeeride pikkuste väärtustega. Vastavalt osavalimile oli uuritavate CpG saitide arv erinev, sõltudes CpG saitide analüüsist väljajätmise kriteeriumitest (Lisa 1). Iga CpG saidi korral hinnati naturaallogaritmitud telomeeri pikkuse mõju CpG saidi metülatsioonitasemele, kohandades soo, vanuse, kehamassiindeksi, suitsetamise, kiibile paigutuse, Q-PCR plaadiefekti ning kuue suurema vererakutüübi suhtes. Analüüs viidi läbi eraldi kõigis seitsmes osavalimis ning oodatava ja vaadeldud telomeeri pikkuse mõju hinnangu p -väärtuste jaotust visualiseeriti kvantiil-kvantiil jooniste abil (Joonis 13).



Joonis 13. EWASi p -väärtuste kvantiil-kvantiil joonised. Seitsme osavalimi oodatava ja vaadeldud p -väärtuse visualiseerimine. x -teljel on ära toodud oodatavad p -väärtused seose mitteolemasolu korral ja y -teljel vaadeldud p -väärtused.

Kvantiil-kvantiil jooniste põhjal eristuvad kaks osavalimit, Valim5 ja Valim7, mille puhul tulemuseks saadud p -väärtuse jaotus erines oodatavast. Antud valimite näol on tegu spetsiaalselt valitud indiviididega, kellel biopangaga liitumise hetkel ei olnud pahaloomulise kasvaja diagnoosi, aga viie aasta jooksul pärast liitumist surid vähki (Valim7) või said eesnäärme vähi diagnoosi (Valim5). Seetõttu jäeti need kaks osavalimit edasistest analüüsides välja.

Järgmiseks ühildati Valim1-4 ja Valim6 üksikanalüüsides tulemused fikseeritud mõjudega meta-analüüsis (Joonis 14A).



Joonis 14. Meta-analüüsi p -väärtuste kvantiil-kvantiil joonis fikseeritud mõjudega (A) ja juhuslike mõjudega (B) meta-analüüsi kvantiil-kvantiil joonis. Graafikutelt on näha CpG saitide testimisel tulemuseks saadud p -väärtuste vaadeldud (y-teljel) ja oodatud (x-teljel) jaotus seose mitteolemasolu korral. Paneelil A punktikeste süstemaatiline eemale kaldumine $x = y$ sirgelt juba väikeste $-\log_{10}(p)$ väärtuste korral viitab võimalikule heterogeensusele. Paneelil B punktikeste kokkulangemine $x = y$ sirgega viitab olukorrale, kus olulisi p -väärtusi ei ole rohkem kui juhuslikult võiks oodata seose mitteolemasolu korral.

Fikseeritud efektidega meta-analüüsi üks eeldustest, et telomeeri pikkuse efekti suurus metülatsiooni muutusele on igas valimis ühesugune, suure osa mudelite korral kinnitust ei leidnud. Seega viidi järgmiseks läbi juhuslike mõjudega meta-analüüs nende sama viie osavalimiga (Joonis 14B) ning leiti, et meta-analüüsi järgselt ei osutunud statistiliselt oluliseks ükski CpG sait. Tabelis 6 on välja toodud viis statistiliselt kõige olulisemat assotsiatsiooni telomeeride pikkuse ja metülatsiooni vahel ning seost iseloomustavad statistikud meta-analüüsis. Tabelist on näha, et meta-analüüsi parimate CpG saitide p -väärtused jäävad alla epigenoomse statistilise olulisuse piiri. Üle-epigenoomsete assotsiatsiooni-analüüsides puhul on soovitatud statistilise olulisuse piiriks valida 10^{-7} , mis vastab umbes 470 000 sõltumatule testile (Lehne jt., 2015). Statistiliselt olulisim CpG sait meie andmestikus oli p -väärtusega $4,07 \times 10^{-6}$.

Tabel 6. Meta-analüüsist välja tulnud viis statistiliselt olulisemat CpG saiti, mis võiksid olla seotud telomeeride pikkusega. Tabelis on ära toodud CpG sait, selle asukoht genoomis (GRCh37.p13), millises kromosoomis CpG sait asub, geen millega vastav CpG sait seotud on, statistikud nagu meta-analüüsi parameetri hinnang, standardviga, *p*-väärtus, mitu üksikanalüüsi oli meta-analüüsis ühildatud, valimimaht kokku ning milline oli iga osavalimi korral telomeeri pikkuse efekti suund metülatsioonile.

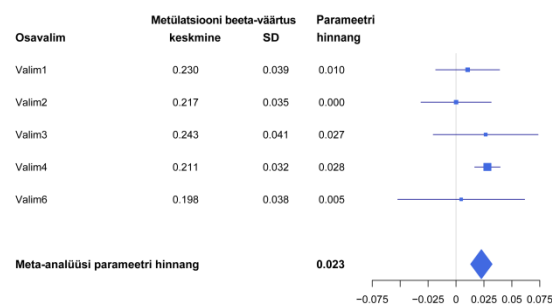
CpG sait (positsioon)	Kromo- soom	Geeni nimi (asukoht/seotus CpG saartega)	Parameetri hinnang*	Standard- viga	Meta- analüüsi <i>p</i> - väärtus	Osavalimite arv meta-analüüsis	Meta-analüüsi valimimaht	Efekti suund
cg21291385 (35448215)	21	<i>MRPS6</i> ; <i>SLC5A3</i> (geenikeha; 5'UTR; CpG rannik)	0,0227	0,0049	$4,07 \times 10^{-6}$	5	626	+ / + / + / + / +
cg06873457 (30116319)	22	<i>CABP7</i> (transkriptsiooni algussait; CpG saar)	0,0071	0,0016	$4,4 \times 10^{-6}$	5	626	+ / + / + / + / +
cg14836555 (24743391)	14	<i>RABGGTA</i> ** (CpG rannik)	0,0257	0,0056	$4,81 \times 10^{-6}$	5	626	+ / + / + / + / +
cg17974460 (202510866)	2	<i>MPP4</i> (geenikeha; CpG rannik)	0,0511	0,0113	$6,96 \times 10^{-6}$	5	623	+ / + / - / + / +
cg19044229 (65374955)	11	<i>MAP3K11</i> (geenikeha; CpG saar)	-0,0055	0,0012	$7,88 \times 10^{-6}$	5	626	- / + / - / - / -

*Telomeeri pikkuse mõju hinnang DNA metülatsiooni muutusele

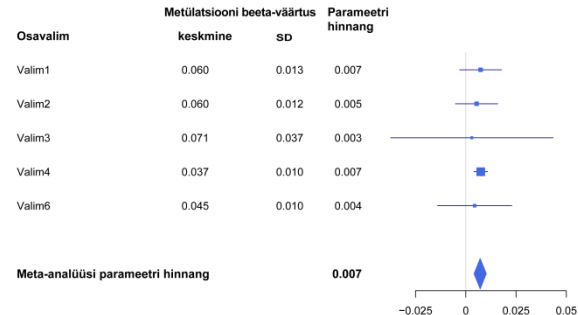
**Lähim geen on *RABGGTA*, millest CpG sait asub ~2500 aluspaari ülesvoolu

Esimese viie meta-analüüsi leiu kohta on tehtud *Forest* joonised, mis peegeldavad eri osavalimite osatähtsust meta-analüüsis (Joonis 15). Jooniselt on näha, et iga CpG saidi puhul on osavalimite seos antud CpG saidiga samasuunaline.

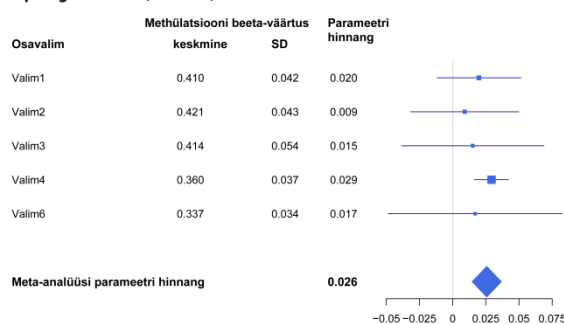
Top1: cg21291385 (MRPS6;SLC5A3, krom 21)



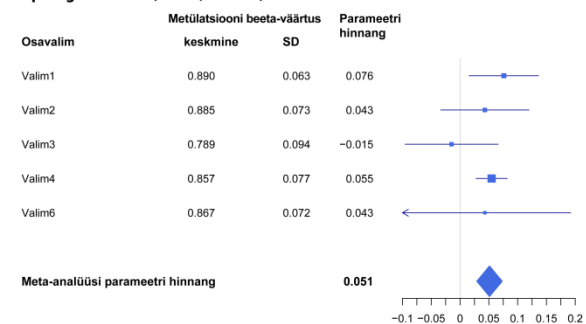
Top2: cg06873457 (CABP7, krom 22)



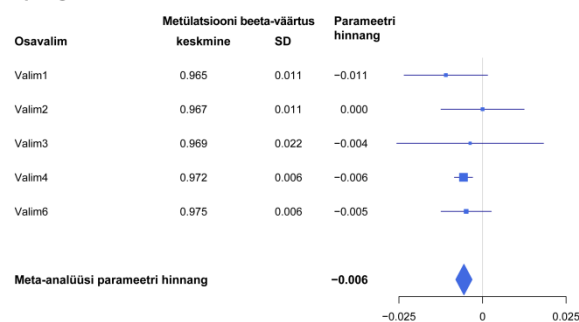
Top3: cg14836555 (krom 14)



Top4: cg17974460 (MPP4; krom 2)



Top5: cg19044229 (MAP3K11; krom 11)

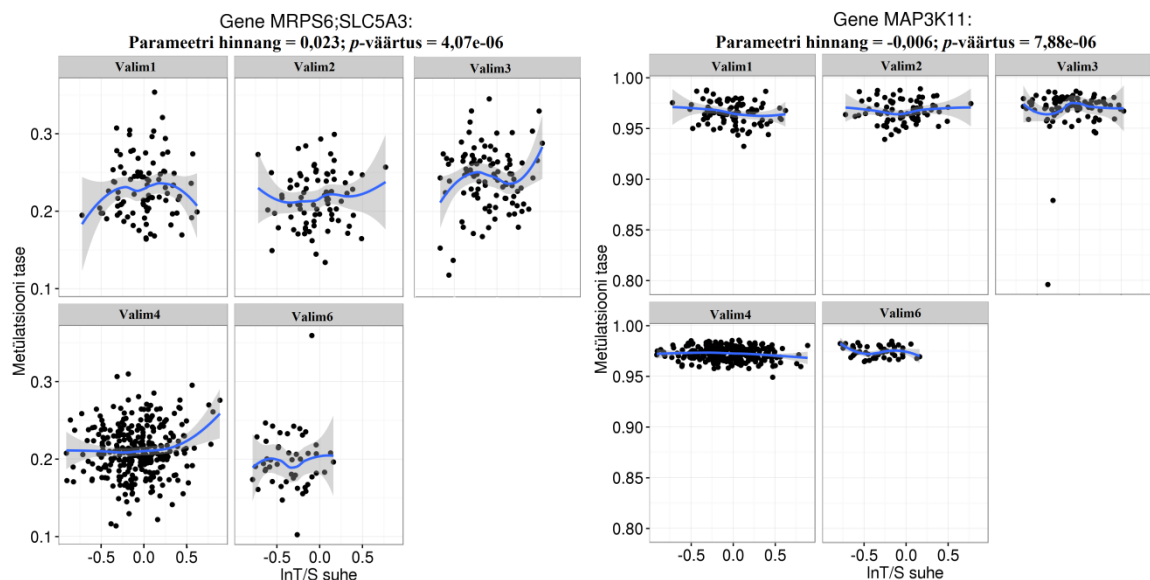


Joonis 15. Meta-analüüsi väikseimate p -väärtustega CpG saitide *Forest* joonised. Iga CpG saidi kohta käiv sinise ruudu suurus on pöördvõrdeline vastava valimi parameetri hinnangu usaldusvahemiku laiusega. Sinise joonega on ära toodud usaldusvahemik. Metülatsiooni beeta-väärtuse keskmine näitab vastava CpG saidi keskmist metülatsiooni taset, SD metülatsiooni beeta-väärtuse standardhälvet ja parameetri hinnang näitab telomeeri pikkuse ühe-ühikulise muutuse mõju DNA metülatsioonile.

Kõigi nelja tähtsuselt esimese CpG saidi korral on pikemad telomeerid seotud kõrgema metülatsiooni tasemega. Kuigi üksikute valimite korral hinnangu usaldusvahemik katab ka nulli, siis samasuunalised seosed annavad alust uskuda seose õigsuses. Tähtsuselt viienda CpG saidi puhul näeme, et pikemad telomeerid on seotud madalama metülatsiooni tasemega. Suurimat kaalu on kõigil *Forest* joonistel näha Valim4 puhul, kus mängib olulist rolli osavalimisse kuuluv suurem indiviidide hulk võrreldes nelja ülejäänud osavalimiga. *Forest*

jooniselt (Joonis 15) on näha ka, et antud CpG saitide keskmine metülatsioonitase varieerub vahemikus 0,037-0,975.

Samuti tehti meta-analüüsi kahe võimaliku bioloogilise tähtsusega CpG saidi kohta hajuvusdiagrammid, mis asuvad geenides *MRPS6/SLC5A3* ja *MAP3K11* (Joonis 16).



Joonis 16. Hajuvusdiagramm osavalimite kaupa. Naturaallogaritmitud telomeeride pikkuse ja metülatsioonitaseme seoste kujutamine hajuvusdiagrammil geenide *MRPS6/SLC5A3* (meta-analüüsi parameetri hinnang = 0,023; p -väärtus = $4,07 \times 10^{-6}$) ja *MAP3K11* (meta-analüüsi parameetri hinnang = -0,006; p -väärtus = $7,88 \times 10^{-6}$) puhul. x -teljel on ära toodud naturaallõgaritmitud T/S suhe ja y -teljel metülatsioonitase, sinise joonega on tähistatud metülatsioonitase ja telomeeri pikkuse vahelist keskmist seost, halli varjundiga on kujutatud keskmise usaldusvahemikku lokaalse regressiooni põhjal, mille puhul hinnatavale andmepunktile annavad suurema kaalu lähemal asuvad andmepunktid, p -väärtus näitab seose statistilist olulisust ja parameetri hinnang telomeeri pikkuse ühe-ühikulise muutuse mõju DNA metülatsioonile.

Jooniselt näeme, et geeni *MRPS6/SLC5A3* puhul on DNA metülatsiooni tase ja telomeeride pikkus omavahel positiivses korrelatsioonis kõigi viie osavalimi lõikes. Samas on näha, et *MAP3K11* geeni puhul on negatiivne seos DNA metülatsiooni tasemega ja telomeeride pikkuse vahel.

4. Arutelu

Üle-epigenoomse assotsiatsiooniuuringu eesmärgiks oli leida uusi või varem kirjeldatud seoseid DNA metülatsioonitaseme ja telomeeride pikkuse vahel. Varasemalt on mitmed uuringud kinnitanud telomeeride pikkuste vahelisi seoseid erinevate geenivariantidega (Codd jt., 2013). Samuti on varasemalt olnud uuringuid, kus on kirjeldatud mitmete CpG saitide DNA metülatsioonitaseme ja geenide seost telomeeride pikkusega (Buxton jt., 2014).

Seosed telomeeride pikkuse ja vananemise vahel ning telomeeride roll vanusega ja enneaegse vananemisega seotud haigustel on hästi dokumenteeritud (Aubert ja Lansdorp, 2008). Siiski, telomeeride pikkuse ja metülatsioonitaseme kirjeldamise puhul on oldud tagasihoidlikud. Varasema kirjanduse põhjal võib arvata, et kui metülatsioon ja telomeeri pikkus on mõlemad seotud muutustega vananemisel, siis võiksid nad ka omavahel seotud olla, aga selle kohta, kas ja kuidas nad seotud on, puudub seni veel terviklik pilt.

Käesoleva uuringu tulemused telomeeride pikkuse ja indiviidide vanusega olid negatiivses korrelatsioonis, mida on ka varem kirjanduses kirjeldatud (Blackburn, 2001). Samuti oli tulemustes väljendunud, et naiste telomeerid on keskmiselt pikemad kui meeste omad (Hunt jt., 2008). Põhiliselt on seda seletatud naissuguhormooni östrogeeni positiivsele mõjule telomeraasi regulatsioonis (Kyo jt., 1999).

Üle-epigenoomse assotsiatsiooni-analüüsi tulemustele põhinedes, jäeti edasisest meta-analüüsist välja kaks osavalimit - Valim5 ja Valim7. Antud valimite näol on tegu spetsiaalselt valitud indiviididega, kellel biopangaga liitumise hetkeks ei olnud kasvajat, aga viie aasta jooksul pärast liitumist surid vähki (Valim7) või said vähidiagnoosi (Valim5). Kuna tegu on vähiuuringute valimitega, kus metülatsioonimuster võib potentsiaalselt olla normaalsest eemale kaldunud (Kristensen jt., 2009) juba ilma telomeeride pikkust mudelisse arvestamata, on nende kahe valimi andmete pealt raske tõestada, et telomeeride pikkus on seotud metülatsiooniga. Veelgi enam, näiteks kõige olulisemad geenid assotsiatsiooniuuringu põhjal on *SLFN13* (Valim5) ja *CBLN1* (Valim7), mida on seostatud vähiga, vastavalt nahavähi (Katsoulidis jt., 2010) ja soolevähiga (Wei jt., 2012), mis võib potentsiaalselt seotud olla sellega, et oodatust väiksemad *p*-väärtused võivad viidata võimalikele muutustele isegi täisvere metüloomis vähi tõttu juba enne arsti juures vähi diagnoosi saamist.

Antud töös teostatud meta-analüüsil epigenoomselt statistiliselt olulisi ($p < 10^{-7}$) (Lehne jt., 2015) CpG saite, mis oleksid olnud seotud telomeeride pikkusega, välja ei tulnud. Parimad leiud, mis meta-analüüsis selgusid, olid *MRPS6/SLC5A3*, *CABP7*, *MPP4* ja *MAP3K11*

geenides ning cg14836555 CpG saidi puhul, statistiliselt olulisem neist *MRPS6/SLC5A3* p -väärtusega $4,07 \times 10^{-6}$. Statistiliselt oluliste seoste puudumine võib tuleneda väiksest valimimahust ($N = 747$), mistõttu võib neid viit olulisemat seost vaadelda kui potentsiaalselt tähtsaid CpG saite metülatsiooni ja telomeeride pikkuse regulatsiooni kontekstis.

Antud tulemustes tuli välja *MAP3K11* (ing. k. *mitogen-activated protein kinase 11*) geen, mis kuulub MAPK geeniperekonda, mille liikmeid on varasemalt seostatud hüpometülatsiooniga vananemisel (McClay jt., 2013). *MAP3K11* on positiivne regulaator, mis on vajalik rakujagunemiseks ning *MAPK14* (p38), *MAPK3* (ERK) ja *MAPK8* (JNK1) aktivatsiooniks fosforüülimise teel. Rakyan jt., (2010) on sarnaselt näidanud *MAP3K5* metülatsiooni muutuse seost vanusega ja seotust JNK ja p38 MAPK radadega. *MAP3K5* mängib olulist rolli stressivastuses nagu apoptoosi reguleerimine ning on seotud neurodegeneratiivsete haigustega nagu Alzheimeri tõbi ja Parkinsoni haigus (Takeda jt., 2008). JNK rada mängib kõigi nende kolme haiguse puhul rolli, mis viitab sellele, et kui *MAP3K11* osaleb JNK regulatsioonis, siis on võimalik, et kaudselt osaleb *MAP3K11* ka nende haiguste esinemise mõjutamises. Varem on täheldatud subtelomeersete alade alametülatsiooni näiteks Parkinsoni haiguse puhul (Maeda jt., 2009). Sama grupp näitas ka lühikeste telomeeride subtelomeersete regioonide üleametülatsiooni vere DNAs Alzheimeri tõve puhul (Guan jt., 2011).

Varasemalt on *MAP3K11* geeni puhul väidetud, et see on seotud kasvajate mahasurumismehhanismiga. Knackmuss jt., (2016) on näidanud, et kui *MAP3K11* geen B-eellasrakkudes allareguleerida, siis toimub rakujagunemine kiirendatult. Meta-analüüsi tulemustes on selle CpG saidi metüleeritus väga kõrge, skaalal 0-1 on valimeid läbiv keskmine metüleerituse tase 0,97. Analüüsi tulemustest joonistub välja, et kui telomeeride pikkus on 1 ühiku võrra suurem, siis metülatsioon väheneb -0,006 ühiku võrra, mis tähendab, et kui geen on üleekspressseeritud, siis rakujagunemise kiirus on vähenenud ning see omakorda surub alla kasvajarakkude jagunemist. Antud tulemus toetab DNA metülatsiooni võimalikku seost telomeeride pikkusega. Evolutsiooniliselt on üleüldiselt telomeeridele omastatud kasvajaid mahasuruv roll, et kriitiliselt lühikesete telomeeridega rakud enam jaguneda ei saaks ja kahjustunud rakud ei kuhjuks (Suram ja Herbig, 2014).

Parima p -väärtusega ($p = 4,07 \times 10^{-6}$) tuli meta-analüüsist välja CpG sait cg21291385, mis asub genoomis kahes geenis, *MRPS6* ja *SLC5A3*. Tulemustest selgub, et viie osavalimi lõikes on antud CpG saidi metülatsioonitase keskmiselt ~0,22 ning telomeeride pikenemisel ühe ühiku võrra suureneb selle CpG saidi DNA metülatsioon 0,0227 ühiku võrra. Mis tähendab, et nende geenide metüleerituse tase võib potentsiaalselt rolli mängida telomeeri pikkuse

regulatsioonis. Varasemalt on näidatud, et nende geenide vahelisel alal olev rs9982601 polümorfism on seotud müokardi infarktiga ja sellele järgneva suremusega (Szpakowicz jt., 2015). Vastuoluliselt on Weischer jt., (2012) näidanud, et lühike telomeeride pikkus on seotud võrdlemisi tagasihoidlikult müokardi infarkti ja südame isheemiatõve suurenenud riskiga (Weischer jt., 2012). Siit lähtudes võiks lühike telomeeride pikkus olla kui degeneratiivse fenotüübi marker, kus kokkupuude kardiovaskulaarsete riskifaktoritega põhjustab erinevate rakufunktsioonide kahjustusi ja suurenenud koe mitoosi ning seetõttu ka potentsiaalselt lühemaid telomeere ning vähenenud DNA metülatsioonitaset. Degeneratiivne fenotüüp võib omakorda suurendada riski müokardi infarkti ja südame isheemiatõve avaldumiseks. Seega on võimalik, et antud CpG sait cg21291385 võib olla seotud epigeneetiliste muutustega, mis indutseeriksid telomeeride kiiremat lühenemist.

Teine olulisem CpG sait cg06873457 oli üllatuseks tugevalt alametüleeritud. Antud CpG sait asub geenis *CABP7*. Uurides lähemalt, miks võiks organismil vajalik olla selle geeni ekspresseerumine, leidsin, et geen on oluline rakujagunemisel. Nimelt ennetab *CABP7* geenifunktsioon ära organiseeritud lüsoosoomide klasterdumist tsütokineesi ajal, kus lüsoosoomid eemaldavad tsütoskeleti komponente enne kui membraani jagunemine saab jätkuda või tagavad membraani reservuaari, mis on vajalik rakujagunemiseks (Matteoni ja Kreis, 1987). Siinkohal võib spekuloida, et kui *CABP7* geen oleks metüleeritud ja tema ekspressioon alla surutud, siis ei saaks rakud jaguneda ning toimuks üleüldine kasvu peetus.

Tähtsuselt kolmandat CpG saiti cg14836555, mis asub *RABGGTA* geeni alguses, varem telomeeride pikkusega seostatud ei ole. Antud juhul on huvitav, et Ensembl (www.ensembl.org) andmebaasi andmetel on sellest CpG saidist kauguselt kolmas geen *TINF2* (ing. k. *Interacting Nuclear Protein 2*) (GRCh37.p13), mille puhul on varem kirjanduses korduvalt näidatud, et mutatsioonide esinemine *TINF2* geenis, on seotud erinevate telomeroopaatiatega nagu idiopaatiline kopsufibroos ja kaasasündinud düskeratoos (Savage jt., 2008; Hoffman jt., 2016; Walne jt., 2008; Yang jt., 2011).

Meta-analüüsi käigus välja tulnud CpG saidi cg17974460 puhul, mis asub *MPP4* geenis, on tulemustest näha, et kui telomeeride pikkus ühe ühiku võrra suureneks, siis metülatsioonitase suureneks 0,0511 võrra. Varasemalt on kirjandusest teada, et oksüdatiivse stressi puhul on *MPP4* geen ülereguleeritud. Samuti on varasemalt teada, et oksüdatiivne stress põhjustab telomeeride kiiremat lühenemist (von Zglinicki, 2002). Meta-analüüsi tulemustele baseerudes, oli CpG sait viie osavalimi lõikes kõrgelt metüleeritud (beeta = 0,8576) ehk *MPP4* geen on meie valimis pigem allareguleeritud. Seega võib ainult oletada, et antud CpG sait on

potentsiaalne telomeeride pikkuse regulaator, mille metülatsioon on oksüdatiivse stressifaktori avaldumise korral muutunud.

Selle uuringu käigus leiti võimalikke seoseid DNA metülatsioonimustri ja telomeeride suhtelise pikkuse regulatsiooni vahel, mis suurema valimimahu korral võiksid potentsiaalselt ületada ka epigenoomse statistilise olulisuse piiri. Tulemustest lähtuvalt võib arvata, et kronoloogilise vanuse epigeneetiline muster on potentsiaalselt seotud telomeeride lühenemisega. On võimalik, et lookused, kus metülatsioonimuster on seotud kronoloogilise vanuse ja telomeeri pikkusega, võivad olla olulised faktorid leidmaks vananemist indutseerivaid faktoreid.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö teoreetilises osas anti ülevaade telomeeride struktuurist ja funktsioonist, toodi näiteid, miks telomeeride pikkus on oluline ja, et telomeeride lühenemine põhjustab erinevaid vanusega seotud haiguseid. Samuti tehti kokkuvõtte, mis meetoditel on tänapäeval võimalik telomeere mõõta ning mis on iga meetodi plussid ja miinused. Samaväärne oli kokkuvõtte toomine DNA metülatsiooni määramise meetoditest, kuna DNA metülatsioonimustri muutumine põhjustab samuti erinevaid vananemisega seotud haigusi.

Käesoleva töö praktilise osa eesmärk oli leida, kas telomeeride pikkus ja DNA metülatsiooni tase on bioloogilisel vananemisel seotud ning kui on, siis mis määral. Selleks mõõdeti 844 indiviidi telomeeride suhtelised pikkused. Tulemused toetasid varem kirjandusest teadaolevat, et telomeeride pikkus lüheneb vananemisel (López-Otín jt., 2013). Seejärel viidi läbi üle-epigenoomne assotsiatsiooniuring, mille tulemuste põhjal eemaldati lõppvalimist kaks valimit, mis koosnesid viie aasta jooksul vähi-diagnoosi saanud või vähki surnud indiviididest, kellel võib DNA metülatsiooni muutus seotud olla vähi tekkimisega ning raske oleks edasistes tulemustes välja selgitada telomeeride pikkuse muutuse mõju DNA metülatsioonile.

Meta-analüüsi tulemustes ei tulnud välja statistiliselt olulisi CpG saite, kuid leiti võimalikke seoseid telomeeride pikkuse ja metülatsioonimustri vahel *MRPS6/SLC5A3*, *CABP7*, *MPP4* ja *MAP3K11* geenides ja CpG saidis cg14836555. Bioloogiliselt võiksid olulisemad leiud seostuda *MAP3K11* geeniga. Varem on *MAP3K11* geeni olulisust kirjeldatud rakujagunemise regulatsioonis (Knackmuss jt., 2016). Meta-analüüsi tähtsamate leidude potentsiaalse bioloogilise olulisuse kindlaks määramiseks on tarvilik uurida neid seoseid suurema valimimahuga meta-analüüsis.

Associations between telomere length and DNA methylation levels

SUMMARY

Marili Palover

Telomeres are like „caps“ of chromosomes that have been widely studied since the knowledge that telomere loss cause cell senescence. The gradual loss of telomere repeats contributes to replicative senescence and loss of telomeres have been implicated in many age-related diseases. DNA methylation is a crucial epigenetic modification of the genome involved in regulating many cellular processes and a growing number of human diseases have been found to be associated with altered DNA methylation. Several recent studies have showed the associations between DNA methylation and telomere length regulation. In this study we reviewed the methods that are most commonly used to measure the telomere length and DNA methylation, which have both been used in studies of age-related diseases.

In this study, the data was collected from the Estonian Genome Center, University of Tartu. Telomere length was measured by Q-PCR and DNA methylation was analyzed using the Infinium HumanMethylation450 BeadChip. The objective of the experimental part of the study was to find associations between telomere length and DNA methylation by investigating > 450 000 CpG sites.

After measuring mean telomere length and methylated cytosine levels, we conducted an epigenome-wide association study (EWAS). Association between methylation levels and ln-transformed telomere length was assessed using linear models adjusted for age, sex, smoking, body mass index and technical factors like batch effect. Valim5 and Valim7 were excluded from the final sample set before meta-analysis, due to inflated *p*-values in the EWAS.

Finally, we conducted meta-analysis with five data sets. As a result, we did not observe any epigenome-wide statistically significant relationship between telomere length and DNA methylation. The top association was with cg21291385 CpG site with the *p*-value of $4,07 \times 10^{-6}$. This CpG site is located in the *MRPS6/SLC5A3* locus, which has been associated with degenerative phenotypes. The second association that I would like to point out was located in the *MAP3K11* gene associated with cell division. Another two genes, *MPP4* and *CABP7* and CpG site cg14836555 came up in the meta-analysis, which may be potentially involved in the regulation of telomere length.

We can only speculate, that these five CpG sites that we found are associated with telomere length and therefore associated with biological age, degenerative phenotype and age-related diseases. Bigger dataset is needed to show the possible actual biologically and statistically significant relationship between telomere length and DNA methylation.

Tänuavaldused

Autor tänab Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramut töös kasutatud geenidoonorite andmete kasutamise eest, kõiki geenidoonoreid ning töö juhendajaid Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu vanemteadur Lili Milanit ja Silva Kaselat panuse eest käesoleva töö valmimises.

Autor tänab ka oma lähedasi ja kooriõdesid toetuse ning innustuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Allshire, R. C., Dempster, M., ja Hastie, N. D. (1989). Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic acids research*, 17(12), 4611–4627.
- Alter, B. P., Baerlocher, G. M., Savage, S. a, Chanock, S. J., Babette, B., Willner, J. P., Weksler, B. B. (2007). Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*, 110(5), 1439–1447.
- Ambrose, A. J., Barua, S. R. (2004). The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease, 43(10), 1731–1737.
- Andrew, T., Aviv, A., Falchi, M., Surdulescu, G. L., Gardner, J. P., Lu, X., Spector, T. D. (2006). Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *American journal of human genetics*, 78(3), 480–486.
- Armanios, M. (2013). Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs clinical paradigms. *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), 996–1002.
- Armanios, M. ja Blackburn, E. H. (2012). The telomere syndromes. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 693–704.
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., ja Irizarry, R. A. (2014). Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, 30(10), 1363–1369.
- Aubert, G., Hills, M., ja Lansdorp, P. M. (2012). Telomere length measurement-Caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1-2), 59–67.
- Aubert, G. ja Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiological reviews*, 88(2), 557–579.
- Aviv, A. (2006). Telomeres and human somatic fitness. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 61(8), 871–873.
- Baird, D. M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., ja Kipling, D. (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nature genetics*, 33(2), 203–207.
- Barlow, D. P. (2011). Genomic Imprinting: A Mammalian Epigenetic Discovery Model. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 379–403.
- Bayne, S. ja Liu, J.-P. (2005). Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 240(1-2), 11–22.
- Bell, J. T., Tsai, P. C., Yang, T. P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Deloukas, P. (2012). Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genetics*, 8(4).
- Benetos, A., Gardner, J. P., Zureik, M., Labat, C., Xiaobin, L., Adamopoulos, C., Aviv, A. (2004). Short Telomeres Are Associated with Increased Carotid Atherosclerosis in Hypertensive Subjects. *Hypertension*, 43(2 I), 182–185.
- Bernstein, B. E., Stamatoyannopoulos, J. A., Costello, J. F., Ren, B., Milosavljevic, A., Meissner, A., Thomson, J. A. (2010). The NIH Roadmap Epigenomics Mapping

- Consortium. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1045–1048.
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288–295.
- Blackburn, Elizabeth H , Gall, Joseph, G. (1978). A Randomly Repeated Sequence at the Termini of the Extrachromosomal Ribosomal RNA Genes in Tetrahymena. *Journal of Molecular Biology*, 120, 33-53.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106(6), 661–673.
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., ja Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265), 1193–1198.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W., ja Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature medicine*, 12(10), 1133–1138.
- Blasco, M. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology*, 3(10), 640–649.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611–622.
- Bock, C. (2012). Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nature Reviews Genetics*, 13(10), 705–719.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, E. M., Sanches, F. J., Sinsheimer, J. S., Horvath, S., Vilain, E. (2011). Epigenetic Predictor of Age. *Current Science*, 6(6), 1–6.
- Britt-Compton, B., Rowson, J., Locke, M., Mackenzie, I., Kipling, D., ja Baird, D. M. (2006). Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Human Molecular Genetics*, 15(5), 725–733.
- Broer, L., Codd, V., Nyholt, D. R., Deelen, J., Mangino, M., Willemsen, G., Boomsma, D. I. (2013). Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *European journal of human genetics*, 21(10), 1163–8.
- Brouillette, S., Singh, R. K., Thompson, J. R., Goodall, A. H., ja Samani, N. J. (2003). White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), 842–846.
- Brouillette, S. W., Moore, J. S., McMahon, A. D., Thompson, J. R., Ford, I., Shepherd, J., Samani, N. J. (2007). Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet*, 369(9556), 107–114.
- Busche, S., Ge, B., Vidal, R., Spinella, J. F., Saillour, V., Richer, C., Pastinen, T. (2013). Integration of high-resolution methylome and transcriptome analyses to dissect epigenomic changes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Research*, 73(14), 4323–4336.
- Bustos, M. L., Huleihel, L., Kapetanaki, M. G., Lino-Cardenas, C. L., Mroz, L., Ellis, B. M., Rojas, M. (2014). Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(7), 787–798.
- Buxton, J. L., Suderman, M., Pappas, J. J., Borghol, N., McArdle, W., Blakemore, A. I. F.,

- Pembrey, M. (2014). Human leukocyte telomere length is associated with DNA methylation levels in multiple subtelomeric and imprinted loci. *Scientific reports*, 4, (4954), 1-8.
- Calado, R. T., Regal, J. A., Hills, M., Yewdell, W. T., Dalmazzo, L. F., Zago, M. A., Young, N. S. (2009). Constitutional hypomorphic telomerase mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(4), 1187–1192.
- Calado, R. ja Young, N. (2012). Telomeres in disease. *F1000 medicine reports*, 4(8), 2353-2365.
- Calvanese, V., Lara, E., Kahn, A., ja Fraga, M. F. (2009). The role of epigenetics in aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8(4), 268–276.
- Cawthon, R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), 1-6.
- Cawthon, R. M. (2009). Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 1-7.
- Chai, W., Du, Q., Shay, J. W., ja Wright, W. E. (2006). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Molecular Cell*, 21(3), 427–435.
- Chakhparonian, M. ja Wellinger, R. J. (2003). Telomere maintenance and DNA replication: How closely are these two connected? *Trends in Genetics*, 19(8), 439–446.
- Chen, Z., Tang, H., Qayyum, R., Schick, U. M., Nalls, M. A., Handsaker, R., Reiner, A. P. (2013). Genome-wide association analysis of red blood cell traits in African Americans: The cogent network. *Human Molecular Genetics*, 22(12), 2529–2538.
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Kelsey, K. T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CPG island context. *PLoS Genetics*, 5(8).
- Chrominski, K., ja TKACZ, M. (2010). Comparison of Outlier Detection Methods in Biomedical Data. *Journal of medical informatics*, 16, 89–94.
- Codd, V., Nelson, C. P., Albrecht, E., Mangino, M., Deelen, J., Buxton, J. L., Samani, N. J. (2013). Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nature genetics*, 45(4), 422–427
- Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., Jacobsen, S. E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452(7184), 215–219.
- Collado, M., Blasco, M. A., ja Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130(2), 223–233.
- Craig, J. M. ja Bickmore, W. A. (1994). The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nature genetics*, 7, 376–382.
- D'Mello, M. J. J., Ross, S. A., Briel, M., Anand, S. S., Gerstein, H., ja Paré, G. (2014). Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 8(1), 82–90.
- Day, J. J. ja Sweatt, J. D. (2010). DNA methylation and memory formation. *Nature neuroscience*, 13(11), 1319–1323.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21(4), 532–40.

- De Lange, T. (2005). Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development*, 19(18), 2100–2110.
- Denham, J., Nelson, C. P., O'Brien, B. J., Nankervis, S. A., Denniff, M., Harvey, J. T., Charchar, F. J. (2013). Longer Leukocyte Telomeres Are Associated with Ultra-Endurance Exercise Independent of Cardiovascular Risk Factors. *PLoS ONE*, 8(7), 1-6.
- Ding, Z., Mangino, M., Aviv, A., Spector, T., ja Durbin, R. (2014). Estimating telomere length from whole genome sequence data. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 1–4.
- Doksani, Y., Wu, J. Y., de Lange, T., ja Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF-2 dependent t-loop formation, 155(2), 345–356.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., ja Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), 81–128.
- Farzaneh-Far, R., Lin, J., Epel, E. S., Harris, W. S., Blackburn, E. H., ja Whooley, M. a. (2010). Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 303(3), 250-256.
- Fraga, M. F. (2009). Genetic and epigenetic regulation of aging. *Current Opinion in Immunology*, 21(4), 446–453.
- Fraga, M. F. ja Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, 23(8), 413–418.
- Frigola, J., Song, J., Stirzaker, C., Hinshelwood, R. a, Peinado, M. a, ja Clark, S. J. (2006). Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band. *Nature genetics*, 38(5), 540–549.
- Frommer, M., Mcdonald, L. E., Millar, D. S., Collist, C. M., Wattt, F., Grigg, G. W., Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, 89(5), 1827–1831.
- Galati, A., Micheli, E., ja Cacchione, S. (2013). Chromatin Structure in Telomere Dynamics. *Frontiers in Oncology*, 3, 1–16.
- Gonzalo, S. (2010). Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol*, 109(2), 586–597.
- Greider, C. W. ja Blackburn, E. H. (1985). Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts, 43, 405–413.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., ja De Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503–514.
- Gu, H., Smith, Z. D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., ja Meissner, A. (2011). Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nature protocols*, 6(4), 468–81.
- Guan, J., Guan, W.-P., Maeda, T., ja Makino, N. (2011). The Subtelomere of Short Telomeres is Hypermethylated in Alzheimer's Disease. *Aging and disease*, 3(2), 164–70.
- Han, B. ja Eskin, E. (2012). Interpreting meta-analyses of genome-wide association studies. *PLoS Genetics*, 8(3), 1-11.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sadda, S., Zhang, K. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell*, 49(2), 359–367.

- Harley, C. B., Futcher, A. B., ja Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–60.
- Hayflick, L. ja Moorhead, P. S. (1961). The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., ja Diez, J. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10522–10527.
- Hoffman, T. W., van der Vis, J. J., van Oosterhout, M. F. M., van Es, H. W., van Kessel, D. A., Grutters, J. C., ja van Moorsel, C. H. M. (2016). *TINF2* Gene Mutation in a Patient with Pulmonary Fibrosis. *Case Reports in Pulmonology*, 2016, 1–6.
- Hornsby, P. J. (2006). Short telomeres: Cause or consequence of aging? *Aging Cell*, 5(6), 577–578.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology*, 14(R115), 1–19.
- Hotchkiss, D. (1948). The Quantitative separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 175, 315–332.
- Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., Christensen, B. C., Marsit, C. J., Nelson, H. H., Kelsey, K. T. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC bioinformatics*, 13(1), 86.
- Hultdin, M., Grönlund, E., Norrback, K., Eriksson-Lindström, E., Just, T., ja Roos, G. (1998). Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic acids research*, 26(16), 3651–3656.
- Hunt, S. C., Chen, W., Gardner, J. P., Kimura, M., Srinivasan, S. R., Eckfeldt, J. H., Aviv, A. (2008). Leukocyte telomeres are longer in African Americans than in whites: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study and the Bogalusa Heart Study. *Aging Cell*, 7(4), 451–458.
- Huzen, J., Wong, L. S. M., van Veldhuisen, D. J., Samani, N. J., Zwinderman, A. H., Codd, V., van der Harst, P. (2014). Telomere length loss due to smoking and metabolic traits. *Journal of Internal Medicine*, 275(2), 155–163.
- Irizarry, R. A., Ladd-acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Onyango, P., Cui, H., Andrew, P. (2009). *Nature Genetics*, 41(2), 178–186.
- Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., ja Baylin, S. B. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature genetics*, 7(4), 536–540.
- Jones, P. A. ja Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 3(6), 415–28.
- Jones, P. A. ja Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nature genetics*, 21(2), 163–167.
- Katsoulidis, E., Mavrommatis, E., Woodard, J., Shields, M. A., Sassano, A., Carayol, N., Platanias, L. C. (2010). Role of interferon α (IFN α)-inducible Schlafen-5 in regulation of anchorage-independent growth and invasion of malignant melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40333–40341.
- Kimura, M., Stone, R. C., Hunt, S. C., Skurnick, J., Lu, X., Cao, X., Aviv, A. (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction

- fragment lengths. *Nature protocols*, 5(9), 1596–1607.
- Kleinman, C. L., Gerges, N., Papillon-Cavanagh, S., Sin-Chan, P., Pramatarova, A., Quang, D.-A. K., Jabado, N. (2014). Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR. *Nature genetics*, 46(1), 39–44.
- Knackmuss, U., Lindner, S. E., Aneichyk, T., Kotkamp, B., Knust, Z., Villunger, A., ja Herzog, S. (2016). MAP3K11 is a tumor suppressor targeted by the oncomiR miR-125b in early B cells. *Cell death and differentiation*, 23(2), 242–252.
- Koch, M. C., Reck, K., Shao, K., Lin, Q., Joussen, S., Ziegler, P., May, T. (2013). Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome research*, 23, 248–259.
- Kristensen, L. S., Nielsen, H. M., ja Hansen, L. L. (2009). Epigenetics and cancer treatment. *European Journal of Pharmacology*, 625(1-3), 131–142.
- Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Inoue, M. (1999). Estrogen activates telomerase. *Cancer Research*, 59(23), 5917–5921.
- Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., Van De Rijke, F. M., Dragowska, V., Little, M. T., Dirks, R. W., Tanke, H. J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Molecular Genetics*, 5(5), 685–691.
- Lehne, B., Drong, A. W., Loh, M., Zhang, W., Scott, W. R., Tan, S.-T., Chambers, J. C. (2015). A coherent approach for analysis of the Illumina HumanMethylation450 BeadChip improves data quality and performance in epigenome-wide association studies. *Genome Biology*, 16(37), 1-16.
- Lindqvist, D., Epel, E. S., Mellon, S. H., Penninx, B. W., Révész, D., Verhoeven, J. E., Wolkowitz, O. M. (2015). Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 55, 333–364.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., ja Serrano, M. (2013). The Hallmarks of Aging, 153(6), 1194–1217.
- Lu, H., Liu, X., Deng, Y., ja Qing, H. (2013). DNA Methylation, a hand behind Neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 1–16.
- Maeda, T., Guan, J. Z., Oyama, J. I., Higuchi, Y., ja Makino, N. (2009). Aging-associated alteration of subtelomeric methylation in Parkinson's disease. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(9), 949–955.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., ja Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88(5), 657–666.
- Maksimovic, J., Gordon, L., ja Oshlack, A. (2012). SWAN: Subset-quantile Within Array Normalization for Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChips. *Genome Biology*, 13(6), 1-12.
- Maresca, A., Zaffagnini, M., Caporali, L., Carelli, V., ja Zanna, C. (2015). DNA methyltransferase 1 mutations and mitochondrial pathology: Is mtDNA methylated?

- Marioni, R. E., Harris, S. E., Shah, S., Mcrae, A. F., Zglinicki, T. von, Martin-ruiz, C., Deary, I. J. (2016). Original article The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *International Journal of Epidemiology*, 0(0), 1–9.
- Masi, S., D’Aiuto, F., Martin-Ruiz, C., Kahn, T., Wong, A., Ghosh, A. K., Deanfield, J. E. (2014). Rate of telomere shortening and cardiovascular damage: A longitudinal study in the 1946 British Birth Cohort. *European Heart Journal*, 35(46), 3296–3303.
- Matteoni, R. ja Kreis, T. E. (1987). Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *Journal of Cell Biology*, 105(3), 1253–1265.
- Maunakea, A. K., Nagarajan, R. P., Bilenky, M., Ballinger, T. J., D’Souza, C., Fouse, S. D., Costello, J. F. (2010). Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*, 466(7303), 253–257.
- McClay, J. L., Aberg, K. A., Clark, S. L., Nerella, S., Kumar, G., Xie, L. Y., van den oord, E. J. C. G. (2013). A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects. *Human Molecular Genetics*, 23(5), 1175–1185.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*, 26(2), 234–282.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S., ja Jaenisch, R. (2005). Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 33(18), 5868–5877.
- Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y. S., Wen, J., Hirte, H. W., Farsetti, A. (2000). Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Molecular and cellular biology*, 20(11), 3764–3771.
- Mitchell, J. R., Collins, K., ja Wood, E. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402(6761), 551–5.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(18), 6622–6626.
- Muller, H. J. (1938). The remarking of chromosomes. *The Collecting Net. Woods Hole*, 13, 181–198.
- Muñoz-Espín, D., ja Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(7), 482–96.
- Mägi, R. ja Morris, A. P. (2010). GWAMA: Software for genome-wide association meta-analysis. *BMC Bioinformatics*, 11(288), 1–6.
- Müezzinler, A., Mons, U., Dieffenbach, A. K., Butterbach, K., Saum, K. U., Schick, M., Brenner, H. (2015). Smoking habits and leukocyte telomere length dynamics among older adults: Results from the ESTHER cohort. *Experimental Gerontology*, 70, 18–25.
- Nersisyan, L. ja Arakelyan, A. (2015). Computel: computation of mean telomere length from whole-genome next-generation sequencing data. *PloS one*, 10(4), e0125201.
- Nikitina, T. ja Woodcock, C. L. (2004). Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *Journal of Cell Biology*, 166(2), 161–165.

- O'Sullivan, R. J. ja Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), 171–81.
- Oeseburg, H., De Boer, R. A., van Gilst, W. H., ja van Der Harst, P. (2010). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(2), 259–268.
- Oh, H., Wang, S. C., Prahash, A., Sano, M., Moravec, C. S., Taffet, G. E., Schneider, M. D. (2003). Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5378–5383.
- Okuda, K., Bardeguet, A., Gardner, J. P., Rodriguez, P., Ganesh, V., Kimura, M., Aviv, A. (2002). Telomere length in the newborn. *Pediatric Research*, 52(3), 377–381.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.*, 41, 181–190.
- Palm, W. ja de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual review of genetics*, 42, 301–34.
- Panosian, L., Porter, V. R., Valenzuela, H. F., Zhu, X., Reback, E., Masterman, D., Cummings, J. L., Effros, R. B. (2003). Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiology of Aging*, 24(1), 77–84.
- Podlevsky, J. D., ja Chen, J. J. L. (2012). It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 730(1-2), 3–11.
- Pollina, E. A., ja Brunet, A. (2011). Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene*, 30(28), 3105–3126.
- Rakyan, V. K., Down, T. A., Balding, D. J., ja Beck, S. (2011). Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nature Reviews Genetics*, 12(8), 529–541.
- Rakyan, V. K., Down, T. A., Maslau, S., Andrew, T., Yang, T. P., Beyan, H., Spector, T. D. (2010). Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Research*, 20(4), 434–439.
- Razin, A., ja Cedar, H. (1977). Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7), 2725–2728.
- Reinius, L. E., Acevedo, N., Joerink, M., Pershagen, G., Dahlén, S. E., Greco, D., Kere, J. (2012). Differential DNA methylation in purified human blood cells: Implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS ONE*, 7(7), 1–13.
- Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., ja DePinho, R. a. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96(5), 701–712.
- Rufer, N., Brümmendorf, T. H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Lansdorp, P. M. (1999). Telomere Fluorescence Measurements in Granulocytes and T Lymphocyte Subsets Point to a High Turnover of Hematopoietic Stem Cells and Memory T Cells in Early Childhood. *J. Exp. Med.*, 190(2), 157–167.
- Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E., ja Lansdorp, P. M. (1998). Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nature biotechnology*, 16(8), 743–747.
- Samani, N. J., Boulby, R., Butler, R., Thompson, J. R., ja Goodall, A. H. (2001). Telomere

- shortening in atherosclerosis. *Lancet*, 358(9280), 472–473.
- Sanders, J. L., ja Newman, A. B. (2013). Telomere length in epidemiology: A biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiologic Reviews*, 35(1), 112–131.
- Savage, S. A., Giri, N., Baerlocher, G. M., Orr, N., Lansdorp, P. M., ja Alter, B. P. (2008). TINF2, a Component of the Shelterin Telomere Protection Complex, Is Mutated in Dyskeratosis Congenita. *American Journal of Human Genetics*, 82(2), 501–509.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C. C. A., Patsopoulos, N. A., Moutsianas, L., Wtccc, C. C. jt. (2012). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214–219.
- Selman, M., Buendia-Roldan, I., ja Pardo, A. (2016). Aging and Pulmonary Fibrosis. *Rev Inves Clin.*, (68), 75–83.
- Sfeir, Agnel J, de Lange, T. (2012). Removal of Shelterin Reveals the Telomere End-Replication Problem. *Science*, 336(6081), 593–597.
- Sfeir, A. (2012). Telomeres at a glance. *Journal of cell science*, 125(18), 4173–8.
- Shalev, I., Moffitt, T. E., Sugden, K., Williams, B., Houts, R. M., Danese, A., Caspi, A. (2012). Exposure to violence during childhood is associated with telomere erosion from 5 to 10 years of age: a longitudinal study. *Molecular Psychiatry*, 18(5), 576–581.
- Sharp, A., Stathaki, E., Migiavacca, E., Brahmachary, M., Montgomery, B. S., Dupre, Y., Antonarakis, E. S. (2011). DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome research*, 21(10), 1592–1600.
- Simon, N. M., Smoller, J. W., McNamara, K. L., Maser, R. S., Zalta, A. K., Pollack, M. H., Wong, K. K. (2006). Telomere Shortening and Mood Disorders: Preliminary Support for a Chronic Stress Model of Accelerated Aging. *Biological Psychiatry*, 60(5), 432–435.
- Soares-Miranda, L., Imamura, F., Siscovick, D., Jenny, N. S., Fitzpatrick, A. L., ja Mozaffarian, D. (2015). Physical Activity, Physical Fitness, and Leukocyte Telomere Length. *Med Sci Sports Exerc*, (1), 2525–2534.
- Song, Z., von Figura, G., Liu, Y., Kraus, J. M., Torrice, C., Dillon, P., Rudolph, K. L. (2010). Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood. *Aging Cell*, 9(4), 607–615.
- Szpakowicz, A., Kiliszek, M., Pepinski, W., Waszkiewicz, E., Franaszczyk, M., Skawronska, M., Kaminski, K. A. (2015). The rs9982601 polymorphism of the region between the SLC5A3/MRPS6 and KCNE2 genes associated with a prevalence of myocardial infarction and subsequent long-term mortality. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*, 125(4), 240–248.
- Stanley, S. E., ja Armanios, M. (2015). The short and long telomere syndromes: Paired paradigms for molecular medicine. *Current Opinion in Genetics and Development*, 33, 1–9.
- Strandberg, T. E., Strandberg, A., Saijonmaa, O., Tilvis, R. S., Pitkälä, K. H., ja Fyhrquist, F. (2012). Association between alcohol consumption in healthy midlife and telomere length in older men. The Helsinki Businessmen Study. *European Journal of Epidemiology*, 27(10), 815–822.
- Suram, A. ja Herbig, U. (2014). The replicometer is broken: Telomeres activate cellular senescence in response to genotoxic stresses. *Aging Cell*, 13(5), 780–786.
- Ziller, M. J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T.-Y., Kohlbacher, O., Meissner, A.

- (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), 477–81.
- Takeda, K., Noguchi, T., Naguro, I., ja Ichijo, H. (2008). Apoptosis signal-regulating kinase 1 in stress and immune response. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 48, 199–225.
- Townsley, D. M., Dumitriu, B., ja Young, N. S. (2015). Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*, 124(18), 2775–2784.
- Toyota, M. ja Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol*, 9(5), 349–357.
- Valdes, A. M., Andrew, T., Gardner, J. P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L. F., Spector, T. D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*, 366(9486), 662–664.
- Vasa-Nicotera, M., Brouillette, S., Mangino, M., Thompson, J. R., Braund, P., Clemitson, J.-R., Samani, N. J. (2005). Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *American journal of human genetics*, 76(1), 147–51.
- Vera, E., ja Blasco, M. A. (2012). Beyond average: Potential for measurement of short telomeres. *Aging*, 4(6), 379–392.
- Verde, Z., Reinoso-Barbero, L., Chicharro, L., Garatachea, N., Resano, P., Sanchez-Hernandez, I., Gomez-Gallego, F. (2015). Effects of cigarette smoking and nicotine metabolite ratio on leukocyte telomere length. *Environmental Research*, 140, 488–494.
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., ja Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, 90(1), 7–24.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 339–344.
- von Zglinicki, T. ja Martin-Ruiz, C. M. (2005). Telomeres as biomarkers for aging and age related diseases. *Current molecular medicine*, 5, 197–203.
- Walne, A. J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., Dokal, I., ja Dc, W. (2008). TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. *Blood*, 112(9), 3594–3600.
- Watson, J. D. (1972). Origin of contameric T4 DNA. *Nature*, 239, 197–201.
- Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., ja Schu, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells, 37(8), 853–862.
- Wei, P., Pattarini, R., Rong, Y., Guo, H., Bansal, P. K., Kusnoor, S. V., Morgan, J. I. (2012). The Cbln family of proteins interact with multiple signaling pathways. *Journal of Neurochemistry*, 121(5), 717–729.
- Weischer, M., Bojesen, S. E., Cawthon, R. M., Freiberg, J. J., Tybjrg-Hansen, A., ja Nordestgaard, B. G. (2012). Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(3), 822–829.
- Wentzensen, I. M., Mirabello, L., Pfeiffer, R. M., ja Savage, S. A. (2011). The association of telomere length and cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 20(6), 1238–1250.

- Werner, C., Fürster, T., Widmann, T., Pöss, J., Roggia, C., Hanhoun, M., Laufs, U. (2009). Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*, 120(24), 2438–2447.
- Wilson, V. L. and Jones, P. A. (1983). DNA Methylation Decreases in Aging but Not in Immortal Cells. *Science*, 220, 1055–1057.
- Wilson, V. L., Smith, R. A., Ma, S., ja Cutler, R. G. (1987). Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 9948–9951.
- Wolkowitz, O. M., Mellon, S. H., Epel, E. S., Lin, J., Dhabhar, F. S., Su, Y., Blackburn, E. H. (2011). Leukocyte telomere length in major depression: Correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress - preliminary findings. *PLoS ONE*, 6(3), 1–10.
- Wu, H., Xu, T., Feng, H., Chen, L., Li, B., Yao, B., Conneely, K. N. (2015). Detection of differentially methylated regions from whole-genome bisulfite sequencing data without replicates. *Nucleic acids research*, 43(21), 1-9.
- Xie, W., Barr, C. L., Kim, A., Yue, F., Lee, A. Y., Eubanks, J., Ren, B. (2012). Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell*, 148(4), 816–831.
- Yang, D., He, Q., Kim, H., Ma, W., ja Songyang, Z. (2011). TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23022–23030.
- Yang, Z., Huang, X., Jiang, H., Zhang, Y., Liu, H., Qin, C., Ju, Z. (2009). Short telomeres and prognosis of hypertension in a Chinese population. *Hypertension*, 53(4), 639–645.

LISAD

Lisa 1. Kokkuvõtlik tabel CpG saitide väljajätmise kohta

Osa-valim	Esialgne CpG saitide arv	Proovide arv, kus det P > 0,01 rohkem kui 5% indiviidide korral	Ristreaktiivsete proovide arv	Sugukromosoomidel olevate proovide arv	CpG saidid, mis on polümorfsed ja/või ahela pikendamise positsioonis on polümorfism	Uuritavaid CpG saite lõpuks
Valim1	485512	1428	29084	10406	15041	429553
Valim2	485512	1416	29085	10410	15073	429528
Valim3	485512	4118	28903	10322	14891	427278
Valim4	485512	805	29135	10448	15418	429706
Valim5	485512	697	29203	10693	15219	429700
Valim6	485512	689	29203	10692	15224	429704
Valim7	485512	832	29134	10448	15374	429724

*det P: Detektsiooni *p*-väärtus

LIHTLITSENTS

Mina, Marili Palover (sünnikuupäev 12.06.1991), annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Telomeeride pikkuste seosed DNA metülatsiooniga“, mille juhendajad on Lili Milani ja Silva Kasela,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016